



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102127153 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 20

(21) 申请号 201010591851. X

G01N 33/533 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 12. 16

(71) 申请人 陕西师范大学

地址 710062 陕西省西安市长安南路 199 号

(72) 发明人 侯颖春 王瀚 强荣兵

(74) 专利代理机构 西安恒泰知识产权代理事务

所 61216

代理人 李郑建

(51) Int. Cl.

C07K 7/08 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

G01N 33/50 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 35 页

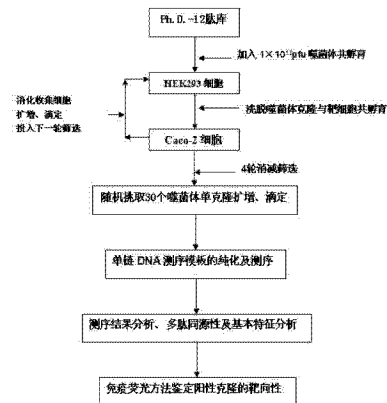
序列表 1 页 附图 8 页

(54) 发明名称

Caco-2 细胞表面特异性结合的多肽及其筛选方法

(57) 摘要

本发明公开了 Caco-2 细胞表面特异性结合的多肽, 利用噬菌体展示随机十二肽库筛选得到 4 条多肽片段, 其氨基酸序列分别为: SPSIDTRYSLRG, CVSVGKPSRP, SVSVGKPSRP 和 MVSMDSRPDRDL。本发明利用噬菌体多肽展示技术筛选结直肠癌 Caco-2 细胞结合的多肽序列, ELISA 鉴定噬菌体克隆与结直肠癌细胞的亲和力, 获得 10 个噬菌体克隆, 测序获得 4 条多肽序列, 其共有氨基酸序列为 XXSXXXXXXXXXX, 同源性分析表明多肽基序可能为肿瘤细胞表面受体结合的配体蛋白上的氨基酸决定簇, 细胞免疫荧光进一步鉴定噬菌体阳性克隆的靶向性结果提示噬菌体阳性克隆能够特异性结合 Caco-2 细胞, 筛选获得的结肠癌 Caco-2 细胞特异性多肽为结直肠癌的早期诊断、抗肿瘤药物的靶向运输及靶向短肽药物的研发提供初步的实验依据。



1. Caco-2 细胞表面特异性结合的多肽,其特征在于,利用噬菌体展示随机十二肽库筛选得到 4 条多肽片段,其氨基酸序列分别为:

SPSIDTRY SRLG ;

CVSVGMKPSRP ;

SVSVGMKPSRP ;

MVSMDSRPDRL。

2. 如权利要求 1 所述的 Caco-2 细胞表面特异性结合的多肽,其特征在于,所述的 4 条多肽片段的氨基酸序列具有一定的同源性,含有共有序列 XXSXXXXXXXXRXX。

3. 如权利要求 1 所述的 Caco-2 细胞表面特异性结合的多肽,其特征在于,所述的 4 条多肽片段均为亲水性多肽。

4. 如权利要求 1 所述的 Caco-2 细胞表面特异性结合的多肽,其特征在于,所述的 4 条多肽片段富含丝氨酸、脯氨酸、精氨酸、缬氨酸和天冬氨酸。

5. 如权利要求 1 所述的 Caco-2 细胞表面特异性结合的多肽,其特征在于,所述的 4 条多肽片段能够特异性结合 Caco-2 细胞,而不识别人胚肾 HEK293 细胞。

6. 权利要求 1 所述的 Caco-2 细胞表面特异性结合的多肽的筛选方法,其特征在于,该方法利用噬菌体随机十二肽库,以体外培养的结直肠癌 Caco-2 细胞系为靶细胞,以人胚肾细胞 HEK293 细胞系为吸附细胞,进行 4 轮全细胞消减筛选,随机挑取 30 个噬菌体克隆扩增并滴定,利用酶联免疫吸附实验鉴定阳性克隆,比较阳性克隆与 Caco-2 细胞的亲和力,排除假阳性克隆,提取阳性噬菌体克隆单链 DNA 测序,分析多肽的氨基酸序列的基本特征,多肽同源性比较,检索出现频率高的多肽基序,BLAST 检索蛋白质数据库,检测多肽基序同源性较高的蛋白质,及可能结合的细胞表面受体和配体;细胞免疫荧光法检测噬菌体多肽克隆的靶向性,进一步鉴定阳性克隆的特异性。

Caco-2 细胞表面特异性结合的多肽及其筛选方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,涉及筛选血管特异性结合肽,特别是一种 Caco-2 细胞表面特异性结合的多肽及其筛选方法。

背景技术

[0002] 结直肠癌 (colorectal cancer) 是消化道常见恶性肿瘤之一,随着经济发展和人民生活水平的不断提高、生活环境、生活方式及膳食结构的改变,发病率近年来有迅猛增高的趋势,在西方发达国家,如美国,结直肠癌的发病率居第四位,在恶性肿瘤死亡原因中居第二位,仅次于肺癌的死亡率,在初诊患者中中晚期癌占大多数,部分病人由于临床症状不明显或较晚发现而致延误治疗,成为威胁人类生命和健康不容忽视的疾病。结肠癌的诊断及外科治疗已取得了长足进步,但早期结肠癌的检出率仍较低而死亡率仍较高,要提高结肠癌术后生存率和降低死亡率的关键就在于早期发现、早期诊断和早期治疗。

[0003] 噬菌体展示技术 (Phage Display Technology) 是一项特异性多肽或蛋白的筛选技术,1985 年由美国 Missouri 大学 G. P. Smith 等首创,此技术可将目的基因编码的多肽以融合蛋白的形式展示于噬菌体表面,被展示的多肽或蛋白可以保持相对独立的空间结构和生物活性,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 (如抗体、酶和细胞表面受体等) 的多肽配体通过体外亲和淘选程序得以快速鉴定。噬菌体展示技术已被广泛用于肿瘤诊断标志物和抗肿瘤先导化合物的筛选、肿瘤特异性抗体和肿瘤药物靶向运输等方面的研究。

[0004] 噬菌体展示技术正逐步发展成熟,为获取对癌症诊断和治疗有价值的多肽或抗体提供了重要手段。目前已发现多种与肿瘤相关的基因和抗原,肿瘤相关配体和多肽的筛选已成为寻找抗肿瘤药物的新热点,针对肿瘤细胞不同表达分子的特异性结合多肽,为肿瘤治疗提供了新的靶点,也为放射标记的肿瘤检测、化疗药物的给药、药物敏感实验及肿瘤的免疫治疗提供了新的分子靶位,噬菌体多肽还具有抑制肿瘤相关基因转录、阻碍肿瘤新生血管生成和转移及诱导肿瘤细胞凋亡等作用,将多肽与脂质体或纳米药物偶联,既有助于在达到更好的靶向治疗效果,又减小了药物的毒副作用,还可用于肿瘤血管三维成像和分子影像技术的检测及肿瘤治疗疗效评价。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于,提供一种 Caco-2 细胞表面特异性结合的多肽及其筛选方法,该方法利用噬菌体展示随机十二肽库筛选出能够和人结直肠癌 Caco-2 细胞株结合的十二肽,并鉴定它们与结肠癌细胞的亲和力和特异性,分析氨基酸序列组成,寻找能够和结肠癌细胞特异性结合的配体,分析这些蛋白与细胞结合的氨基酸决定簇位点,为研究噬菌体展示多肽在肿瘤早期诊断和靶向药物等研究方面提供实验依据。

[0006] 为了实现上述任务,本发明采取如下的技术方案:

[0007] Caco-2 细胞表面特异性结合的多肽,其特征在于,利用噬菌体展示随机十二

肽库筛选得到 4 条多肽片段,其氨基酸序列分别为:SPSIDTRYSLRG, CVSVGMPKSPRP, SVSVGMPKSPRP 和 MVSMDSSPRDRL。

[0008] 4 条多肽均为亲水性多肽,富含丝氨酸、脯氨酸、精氨酸、缬氨酸和天冬氨酸。4 条多肽片段的氨基酸序列具有一定的同源性,含有共有序列 XXSXXXXXXXXRXX;

[0009] 4 条多肽片段能够特异性结合 Caco-2 细胞,而不识别人胚肾 HEK293 细胞。

[0010] 所述的 Caco-2 细胞表面特异性结合的多肽的筛选方法,其特征在于,该方法利用噬菌体随机十二肽库,以体外培养的结直肠癌 Caco-2 细胞系为靶细胞,以人胚肾细胞 HEK293 细胞系为吸附细胞,进行 4 轮全细胞消减筛选,随机挑取 30 个噬菌体克隆扩增并滴定,利用酶联免疫吸附实验鉴定阳性克隆,比较阳性克隆与 Caco-2 细胞的亲和力,排除假阳性克隆,提取阳性噬菌体克隆单链 DNA 测序,分析多肽的氨基酸序列的基本特征,多肽同源性比较,检索出现频率高的多肽基序,BLAST 检索蛋白质数据库,检测多肽基序同源性较高的蛋白质,及可能结合的细胞表面受体和配体;细胞免疫荧光法检测噬菌体多肽克隆的靶向性,进一步鉴定阳性克隆的特异性。

[0011] 本发明利用噬菌体多肽展示技术筛选结直肠癌 Caco-2 细胞结合的多肽序列,ELISA 鉴定噬菌体克隆与结直肠癌细胞的亲和力,获得 10 个噬菌体克隆,测序获得 4 条多肽序列,其共有氨基酸序列为 XXSXXXXXXXXRXX,同源性分析表明多肽基序可能为肿瘤细胞表面受体结合的配体蛋白上的氨基酸决定簇,细胞免疫荧光进一步鉴定噬菌体阳性克隆的靶向性结果提示噬菌体阳性克隆能够特异性结合 Caco-2 细胞,筛选获得的结肠癌 Caco-2 细胞特异性多肽为结直肠癌的早期诊断、抗肿瘤药物的靶向运输及靶向短肽药物的研发提供初步的实验依据。

附图说明

[0012] 图 1 是本发明的具体技术路线图;

[0013] 图 2 是随机十二肽 pIII 融合蛋白的 N 末端序列;

[0014] 图 3 是精简遗传密码表;

[0015] 图 4 是 10 个噬菌体阳性克隆与 Caco-2 细胞亲和力的 ELISA 鉴定;

[0016] 图 5A、B、C、D 分别是四条噬菌体多肽的氨基酸疏水性图;

[0017] 图 6A ~ X 分别是噬菌体阳性克隆靶向 Caco-2 细胞的免疫荧光检测 ($\times 200$) 图,其中:

[0018] A, B, C, D: Caco-2 cells (A and B) and HEK293 cells (C and D) incubated with Q23 positive clone that displays CCSP1 peptide under the light microscope and the fluorescent microscope;

[0019] E, F, G, H: Caco-2 cells (E and F) and HEK293 cells (G and H) incubated with Q24 positive clone that displays CCSP2 peptide under the light microscope and the fluorescent microscope;

[0020] I, J, K, L: Caco-2 cells (I and J) and HEK293 cells (K and L) incubated with Q29 positive clone that displays CCSP3 peptide under the light microscope and the fluorescent microscope;

[0021] M, N, O, P: Caco-2 cells (M and N) and HEK293 cells (O and P) incubated with

Q28 positive clone that displays CCSP4 peptide under the light microscope and the fluorescent microscope;

[0022] Q, R, S, T: Caco-2 cells (Q and R) and HEK293 (S and T) cells incubated with unrelated phages under the light microscope and the fluorescent microscope;

[0023] U, V, W, X: Caco-2 cells (U and V) and HEK293 cells (W and X) incubated with PBS under the light microscope and the fluorescent microscope.

[0024] 以下结合附图和实施方式对本发明作进一步的详细说明。

具体实施方式

[0025] 一、技术路线

[0026] 本发明采用噬菌体多肽展示技术,以人结肠癌 Caco-2 细胞系为靶细胞,以人胚肾 HEK293 细胞为阴性吸附细胞进行 4 轮消减筛选,从噬菌体 12 肽库中筛选能特异性结合结肠癌 Caco-2 细胞的多肽基序,检索其可能识别的细胞表面受体,为结直肠癌早期诊断和靶向治疗的进一步研究提供良好的实验依据,具体技术路线如图 1 所示。

[0027] 二、材料与方法

[0028] 2.1 主要实验材料

[0029] 2.1.1 细胞、噬菌体多肽库、宿主菌

[0030] (1) 细胞株:人结直肠癌细胞株 Caco-2,人胚肾细胞株 HEK293,购于美国 ATCC(Rockville,美国)。

[0031] (2) 噬菌体肽库:随机十二肽噬菌体展示文库 (Ph.D.-12TM Phage Display Peptide Library Kit) 购自 New England Biolabs, USA, 滴度 1.5×10^{13} pfu/ml, 贮存于含 50% 甘油的 TBS 溶液中。复杂度 $\sim 2.7 \times 10^9$ 个转化子,于 M13 噬菌体 cPIII 蛋白的 Kpn-I 和 Eag-I 位点之间插入外源序列。-96gIII 测序引物序列为 5' -HOCCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3'。

[0032] (3) 宿主菌:大肠杆菌 E. coli ER2738 :F' lacIq Δ (lacZ) M15 proA+B+z z f::Tn10 (TetR) / fhuA2 supE thi Δ (lac-proAB) Δ (hsdMS-mcrB)5 (rk-mk-McrBC-)。该菌株以含 50% 甘油的菌体培养物形式贮存于 -80 $^{\circ}$ C: 非感受态细胞,购自 New England Biolabs, USA。

[0033] 2.1.2 主要试剂及耗材

[0034] (1) RPMI 1640 培养基:购自 Gibco 公司。

[0035] (2) DMEM 培养基:购自 Gibco 公司。

[0036] (3) 胎牛血清:购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司。

[0037] (4) 青霉素、链霉素、庆大霉素及胰蛋白酶:购自 Amresco 公司。

[0038] (5) DMSO、台盼蓝:购自 Sigma 公司。

[0039] (6) PEG8000:购自北京索莱宝科技有限公司。

[0040] (7) IPTG、BSA:购自西安沃尔森生物技术有限公司。

[0041] (8) Xgal、DMF、NaN₃、四环素、Tween-20、Agar 购自 Amresco 公司。

[0042] (9) D-Glucose:购自上海生工生物工程公司。

[0043] (10) Bacto-Tryptone、酵母提取物:购自 OXOID, England。

- [0044] (11)Agarose :购自美国 Invitrogen 公司。
- [0045] (12) 山羊抗 M13 多克隆抗体 :购自 Santa Cruz Biotechnology, Inc 公司。
- [0046] (13) 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗山羊 IgG :购自北京博奥森生物技术有限公司。
- [0047] (14) 多聚甲醛 :购自 Sigma 公司。
- [0048] (15)TMB :购自 Boston Biomedica, Inc. (BBI) 公司。
- [0049] (16)FITC 标记兔抗山羊 IgG :购自北京中杉金桥生物技术有限公司。
- [0050] (17) 常规生物化学试剂 :购自西安沃尔森生物技术有限公司。
- [0051] 2.1.3 主要试剂的配制
- [0052] (1) 四环素贮液 :以 20mg/ml 的浓度溶于无水乙醇中,封装至 1.5ml 无菌离心管中,1ml/管, -40℃ 避光保存,用前混匀。
- [0053] (2)5×M9 盐溶液 :称取 Na₂HPO₄·12H₂O 42.74g, KH₂PO₄47.5g, NaCl 1.25g, NH₄Cl2.5g,溶于 400ml 三蒸水中,磁力搅拌至完全溶解,三蒸水定容至 500ml,高压蒸汽灭菌,室温保存。
- [0054] (3)20% Glucose :称取 20g Glucose,溶于 100ml 三蒸水,用 0.22 μ m 过滤器过滤除菌,4℃ 贮存。
- [0055] (4) 含四环素抗性的 1×M9 基本培养基 :取 5×M9 盐溶液 100ml,称取琼脂粉 7.5g,调节 pH 至 7.0,三蒸水定容至 500ml,高压蒸汽灭菌,冷却至低于 70℃ 时,加入无菌的 20% Glucose 10ml,及四环素贮液 625 μ l (终浓度 50 μ g/ml),混匀倒平板。平板 4℃ 避光保存。
- [0056] (5) 含四环素抗性的 LB medium(pH 7.4) :称取胰蛋白胨 5g,酵母提取物 2.5g, NaCl 2.5g,溶解于 400ml 三蒸水中,磁力搅拌至完全溶解。用 1M 的 NaOH 调节 pH 值至 7.0,三蒸水定容至 500ml。高压蒸汽灭菌 30min,冷却至低于 50℃ 时,加入四环素贮液 1.25ml (终浓度 50 μ g/ml),4℃ 避光保存。
- [0057] (6)TBS :50mM Tris-HCl (pH7.5),150mM NaCl,高压灭菌,室温保存。
- [0058] (7)PEG/NaCl :20% (w/v)PEG8000,2.5M NaCl,高压灭菌,室温保存。
- [0059] (8)IPTG/Xgal :将 1.25g IPTG 和 1g Xgal 溶于 25ml DMF 中,充分混匀,锡箔纸包裹, -20℃ 保存。
- [0060] (9)LB/IPTG/Xgal 平板 :1L LB medium,加入 15g 琼脂粉,高压灭菌 30min,室温冷却至低于 70℃ 时,加入 1ml IPTG/Xgal,混匀倒平板。平板 4℃ 避光保存。
- [0061] (10) 顶层琼脂糖 (Top Agarose) :称取 Bacto-Tryptone :1g, yeast extract :0.5g, NaCl : 0.5g, MgCl₂·6H₂O :0.1g, Agarose :0.7g,高压灭菌 30min,封装至无菌 50ml 离心管中,室温保存,用时微波炉融化。
- [0062] (11)PBS 磷酸盐缓冲液 :称取 NaCl 8g, KCl :0.2g, Na₂HPO₄·12H₂O :1.44g, KH₂PO₄ :0.24g,溶于 900ml 三蒸水中,磁力搅拌充分溶解,用 10N HCl 调节 pH 值至 7.4,三蒸水定容至 1L。高压灭菌,室温保存。
- [0063] (12)Blocking buffer :3% BSA 溶于 PBS (pH7.4),0.22 μ m 滤器过滤除菌,4℃ 保存。
- [0064] (13)TBST :50mM Tris-HCl (pH7.5),150mM NaCl, 不同浓度 (v/v) 的 Tween-20 (0.1%、0.2%、0.3%、0.5%),高压灭菌,室温保存。

[0065] (14) RPMI 1640 完全培养基 :取 RPMI 1640 培养基干粉 3 包,溶于 2L 超纯三蒸水,并用三蒸水清洗包装袋 2 ~ 3 次(洗液一并加入培养基中),加入 NaHCO₃ :6g, FBS :300ml, 抗生素各 30ml(青霉素 / 链霉素终浓度为 100U/ml,庆大霉素终浓度为 100 μ g/ml),磁力搅拌至完全溶解,10N HCl 调节 pH 值至 7.2 左右(过滤后 pH 值会升高 0.2 ~ 0.3),超纯三蒸水定容至 3L。0.22 μ m 过滤器过滤除菌,分装于 500ml 灭菌试剂瓶,4℃ 保存。

[0066] (15) DMEM 完全培养基 :取 DMEM 培养基干粉 3 包,溶于 2L 超纯三蒸水,并用三蒸水清洗包装袋 2 ~ 3 次(洗液一并加入培养基中),加入 NaHCO₃ 7.2g, FBS 300ml, 抗生素各 30ml(青霉素 / 链霉素终浓度为 100U/ml,庆大霉素终浓度为 100 μ g/ml),磁力搅拌至完全溶解,10N HCl 调节 pH 值至 7.2 左右,超纯三蒸水定容至 3L。0.22 μ m 过滤器过滤除菌,分装于 500ml 灭菌试剂瓶,4℃ 保存。

[0067] (16) 0.25% Trypsin-0.02% EDTA :称取 0.25g 胰蛋白酶 Trypsin 粉剂,溶于 100ml 0.1MPBS 中,加入 1M EDTA 54 μ l,磁棒慢速搅拌 5 ~ 6 小时,0.22 μ m 过滤器过滤除菌,4℃ 保存。

[0068] (17) 4% 台盼蓝母液 :称取 4g 台盼蓝,加入少量三蒸水研磨,加三蒸水定容至 100ml,用滤纸过滤,4℃ 保存,使用时用 PBS 稀释母液至 0.4% 使用液。

[0069] (18) 4% 多聚甲醛固定液 :称取 4g 多聚甲醛粉末,溶于 100ml PBS(pH7.2),磁力搅拌溶解,稍许加热至 60℃,加入几滴 1M NaOH 助溶完全,0.22 μ m 过滤器过滤,4℃ 保存。

[0070] (19) TMB 底物贮液 :称取 10mg TMB 粉末,溶于 5ml DMSO 中,锡箔纸包裹,4℃ 保存。

[0071] (20) TMB 底物缓冲液 (pH5.5) :溶液 A :柠檬酸 (C₆H₈O₇ · H₂O) 0.1mol/L ; 溶液 B :磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄ · 12H₂O) 0.2mol/L ;将溶液 A、溶液 B 和三蒸水按体积比 24.3 : 25.7 : 50 的比例混合,高压灭菌,4℃ 保存。

[0072] (21) TMB 工作液 :依次取 TMB 底物缓冲液 9.5ml,0.75% H₂O₂ 42 μ l, TMB 底物贮液 0.5ml,于 10ml 灭菌离心管中充分混匀,避光操作,现用现配。

[0073] (22) 显色终止液 :2M H₂SO₄。

[0074] (23) 碘化物缓冲液 :10mM Tris-HCl (pH 8.0),1mM EDTA,4M NaI。室温避光保存。

[0075] 2.2 实验方法

[0076] 2.2.1 细胞培养

[0077] 2.2.1.1 细胞复苏

[0078] 用酒精棉球擦拭超净工作台台面,紫外线照射 30min 以上,37℃ 水浴预热 RPMI1640 培养基和 DMEM 培养基,从液氮罐中取出冻存的 Caco-2 细胞冻存管,迅速将冻存管投入到已经预热的水浴锅中迅速解冻,并不断的摇动,使管中的液体迅速融化。约 1 ~ 2min 后冻存管内液体完全溶解,用酒精棉球擦拭冻存管的外壁,移入超净台内,无菌条件下将细胞悬液转入 10ml 离心管中,加入 5ml RPMI1640 培养基,用托架天平平衡后 800rpm 低速离心 3min,弃上清。加入 RPMI1640 培养基重悬细胞,转入 10cm² 培养瓶中。将培养瓶移至 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 的培养箱内培养。重复同样操作复苏 HEK293 细胞。

[0079] 2.2.1.2 细胞传代培养

[0080] 次日更换培养液一次,待细胞长至 90% 融合时,小心吸弃去旧培养基,用预热的 PBS 轻轻洗涤细胞,加入适量胰蛋白酶消化液 37℃ 消化 3 ~ 5min,倒置显微镜下观察,待细胞胞质回缩变圆、细胞不再粘连成片时,吸弃消化液,加入 RPMI 1640 完全培养基,用滴管

轻柔吹打已消化细胞成细胞悬液,将细胞悬液转移至 10ml 离心管,平衡后将离心管放入台式离心机,800rpm,离心 5min,小心吸弃上清,加入 2ml 培养液,用滴管轻轻吹打细胞悬液,封装于 2 ~ 3 个培养瓶,补足培养基后旋紧瓶盖。倒置显微镜下观察细胞数量,传代细胞密度不应少于 1×10^5 cells/ml,置于 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 孵箱,拧松瓶盖培养。2 ~ 3 日待细胞铺满瓶底继续传代。

[0081] 2.2.1.3 细胞冻存

[0082] 冻存前 24h 进行细胞换液,取培养 2 ~ 3 天对数生长期的细胞,按细胞传代方法收集细胞并计数,以 $1 \sim 5 \times 10^6$ cells/ml 细胞浓度悬浮于含 10% DMSO 的 RPMI 1640 完全培养基中,轻轻反复吹打均匀,1ml/管分装于冻存管中,置于冻存杯中室温放置 2h,于 -80℃ 超低温冰箱中过夜,次日置于液氮罐中长期保存并做好冻存记录。

[0083] 2.2.2 宿主菌 E. coli ER2738 的活化

[0084] (1) 复苏:取 250 μ l LB-Tet 液体培养基于 1.5ml 无菌离心管中,以无菌技术从 E. coli ER2738 的甘油冻存物中取出 2 ~ 3 μ l 菌液与之充分混匀,滴加至 M9-Tet 平板,用灭菌玻璃珠涂布 2 ~ 3min,倒出玻璃珠,平板室温放置 5min,标记后置于 37℃ 细菌培养箱倒置培养过夜。次日长出克隆后封口膜封口,4℃ 避光保存备用。

[0085] (2) 培养:取 3ml LB-Tet 液体培养基置于 10ml 灭菌离心管中,用无菌枪头以无菌技术挑取单克隆置于其中,标记后置于恒温摇床 37℃,300rpm 振荡培养过夜。细菌扩增液于 4℃ 保存备用,取一管细菌与灭菌甘油 1 : 1 混合,分装于 1.5ml 无菌离心管,每管 1ml, -80℃ 超低温冰箱保存。

[0086] 2.2.3 噬菌体展示十二肽库的消减筛选

[0087] 以人胚肾 HEK293 细胞为阴性吸附细胞,结肠癌 Caco-2 细胞为靶细胞,参照随机十二肽噬菌体展示文库 (Ph. D. -12TM Phage Display Peptide Library Kit) 使用说明书,优化改良筛选方法,进行 4 轮消减筛选,保持每一轮筛选投入噬菌体量不少于 1.5×10^{10} PFU。第一轮筛选程序如下:

[0088] (1) 细胞准备:将生长状态良好的人结肠癌细胞 Caco-2 和人胚肾 HEK293 细胞,分别传代,接种于 10cm² 细胞培养瓶,置于 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 孵箱培养 24h 后换液,培养至细胞贴壁,生长状态良好,待融合度为 90% 以上,汇合成单层细胞时进行筛选。

[0089] (2) 细菌活化:将过夜振荡培养的 ER2738 以 1 : 100 稀释于 20ml LB-Tet 液体培养基中,37℃,225rpm,缓慢振摇 2 ~ 3h 至对数前期,于紫外分光光度计上测 OD₆₀₀ ~ 0.5。

[0090] (3) 封闭:取融合度为 90% 以上的 HEK293 细胞,吸弃培养基,用 PBS 轻轻洗涤两次,加无血清培养基,37℃、5% CO₂ 培养 1h,吸去培养液,加入 Blocking buffer (3% BSA+PBS),37℃ 封闭 2h;重复同样操作,封闭结肠癌细胞 Caco-2 细胞。

[0091] (4) 洗涤:吸弃封闭液,用 0.1% TBST 轻柔地洗涤 6 次,操作要避免细胞脱落。

[0092] (5) 阴性细胞吸附:将 10 μ l 噬菌体库 (第 2 轮至第 4 轮筛选取扩增库 1.5×10^{10} PFU) 与 1ml TBS 混合,与 HEK293 细胞孵育,37℃,孵育 1h,孵育期间每隔 15min 放脱色摇床上微摇。

[0093] (6) 取上清:用吸管缓慢吸取上清,转移至 2ml 灭菌离心管,1000rpm,离心 5min,转移上清至新离心管,再离心一次以去除上清中可能含有的细胞。

[0094] (7) 结合:迅速将上清与已封闭、洗涤好的结肠癌 Caco-2 细胞孵育,37℃,孵育 2h。

[0095] (8) 洗涤:小心吸弃上清,消化收集细胞于离心管,1000rpm,离心 5min,吸弃上清,用 0.1% TBST 反复吹打洗涤 Caco-2 细胞 20 次,1000rpm,离心 5min,重复洗涤 4 次,弃尽上清获得细胞沉淀,用无菌滤纸条吸尽剩余液滴。

[0096] (9) 扩增:将细胞沉淀加入已摇至对数前期的 ER2738 菌液中,置于恒温摇床,37°C,225rpm,振荡培养 4.5h。

[0097] (10) 噬菌体纯化:

[0098] ①将噬菌体扩增菌液分装于灭菌的 1.5ml 离心管,每管 1ml,13000rpm,离心 10min,上清转入新离心管中,再离心,取上清上部 80%转入新离心管中。

[0099] ②加入 1/6 体积的 PEG/NaCl (167 μ l/tube),反复 vortex 混匀,4°C 沉淀噬菌体过夜。

[0100] ③次日,4°C,13000rpm,离心过夜沉淀物 15min。

[0101] ④倒掉上清,再次短暂离心,用微量移液器吸尽残留上清液。

[0102] ⑤每管加入 1ml TBS 重悬沉淀,反复 vortex 混匀,悬液转移至灭菌 1.5ml 离心管中,4°C,13000rpm,离心 5min,以去除残余细胞。

[0103] ⑥上清转入另一无菌微量离心管中,用 1/6PEG/NaCl (170 μ l/tube),反复 vortex 混匀,再次沉淀,冰上孵育 60min,4°C,13000rpm,离心 10min。

[0104] ⑦弃上清,再次短暂离心,用微量移液器吸去残余上清。

[0105] ⑧每管加入 200 μ l TBS/0.02% NaN₃,反复 vortex 混匀,短暂离心 1min,沉淀任何残余不溶物,上清转入新 1.5ml 离心管中,此即为扩增后的一级库,标记,以 1 : 1 加入灭菌甘油,-20°C 保存。

[0106] (11) 噬菌体滴定:

[0107] ①取 2 ~ 3 μ l E. coli ER2738 宿主菌,涂布 M9-Tet 平板,置于恒温培养箱 37°C 倒置培养过夜。

[0108] ②菌操作挑取分离良好的单克隆于 3ml LB-Tet 液体培养基中,置于恒温摇床 37°C,300rpm,振荡培养 16 ~ 18 小时。

[0109] ③将过夜 ER2738 培养物 1 : 100 稀释于 3ml LB-Tet 培养基中,225rpm,振荡培养 1.5h ~ 2h,至 OD₆₀₀ ~ 0.5。

[0110] ④准备 5 个 LB/IPTG/Xgal 平板于 37°C 恒温培养箱预热 (每个噬菌体稀释度对应一个平板)。

[0111] ⑤预先准备 45°C 水浴,微波炉中融化 Top Agarose,分装于 10ml 离心管中,3ml/tube,置于水浴中备用。

[0112] ⑥将 ER2738 (OD₆₀₀ ~ 0.5) 分装于 1.5ml 灭菌离心管中 (每个噬菌体稀释度对应一管),200 μ l/tube,4°C 保存备用。

[0113] ⑦在 LB 中准备 10 倍系列稀释的噬菌体扩增库,稀释范围为 10² ~ 10¹¹。

[0114] ⑧取 10⁷ ~ 10¹¹ 不同噬菌体稀释度,每管 10 μ l,分别与 200 μ l 宿主菌混合,快速振荡混匀,室温温育 5min。

[0115] ⑨将感染的细菌快速加入 45°C 预温的 Top Agarose 中,每次一管,快速 vortex 混匀,立即倾注于 37°C 预热的 LB/IPTG/Xgal 平板上,快速旋转倾斜平板使之均匀铺展开来。室温冷却 5min,置于恒温培养箱中,37°C 倒置培养过夜。

[0116] ⑩次日,待平板长出蓝斑,选择密度合适(~100个蓝斑)的平板计数,计算扩增噬菌体库的滴度。计算方法如下:扩增噬菌体库的滴度=(蓝斑数目×对应噬菌体稀释倍数)/10 μ l(pfuf/ μ l)。

[0117] (12) 下一轮筛选:将滴定后的次级库再次与 HEK293 细胞和结肠癌 Caco-2 细胞孵育,筛选过程如上述,分别用上一轮结合、扩增、滴定的噬菌体次级库,进行 3 轮筛选,每轮筛选投入的噬菌体量均为 1.5×10^{10} PFU,逐轮增加筛选强度:与阴性细胞 HEK293 细胞孵育时间增加至 1.25h、1.5h、2h;与靶细胞 Caco-2 细胞孵育时间每轮筛选减少为 1.5h、1.25h、1h;TBST 洗涤次数相应增加为 6 次、8 次、10 次;洗涤液中 Tween-20 浓度依次增加为 0.2%、0.3%、0.5%。

[0118] 2.2.4 细胞 ELISA 初步鉴定噬菌体阳性克隆

[0119] 2.2.4.1 噬菌体单克隆的制备

[0120] (1) 经过第 4 轮筛选获得的噬菌体不经过扩增,直接感染宿主菌 *E. coli* ER2738,滴定铺制 LB/IPTG/Xgal 平板,37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。

[0121] (2) 将过夜培养的宿主菌按 1:100 比例稀释于 LB-Tet 液体培养基,分装于 30 个 10ml 离心管,每管 3ml。

[0122] (3) 无菌操作,从长出蓝斑数目~100 的平板上,随机挑取 30 个噬菌体克隆,接种到分装好的离心管中,于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床,225rpm,缓慢振摇 4.5h。

[0123] (4) 将每个噬菌体单克隆扩增液分装于灭菌 1.5ml 离心管中,按照上述“噬菌体纯化”方法纯化每个单克隆。

[0124] (5) 滴定每一个噬菌体单克隆。

[0125] (6) 以同样方法滴定原始噬菌体文库,从滴定平板上随机提取一个克隆扩增、滴定,以作为阴性噬菌体克隆对照。

[0126] 2.2.4.2 ELISA 法鉴定噬菌体单克隆与结肠癌细胞结合的特异性

[0127] 以人胚肾细胞系 HEK293 细胞为阴性对照细胞,人源结肠癌细胞系 Caco-2 细胞为靶细胞,用全细胞酶联免疫吸附实验(ELISA)鉴定随机挑取的 30 个噬菌体克隆结合特异性和亲和力,以排除假阳性和非特异性克隆,同时设立 PBS 对照及原始噬菌体文库单克隆对照(无关克隆对照)。具体操作方法如下:

[0128] (1) 取生长状态良好的结肠癌细胞 Caco-2 和 HEK293 细胞,传代消化,细胞计数,接种 96 孔细胞培养板,密度 4×10^5 cells/ml,每孔 200 μ l,每组设两个复孔,置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 24~36h,待细胞贴壁长满单层进行下步实验。

[0129] (2) 吸弃培养基,用预热的 PBS 洗涤 2 次,每孔加入 200 μ l 无血清培养基,置细胞培养箱孵育 1h。

[0130] (3) 吸弃培养基,PBS 洗涤 2 次,加入 4%多聚甲醛,100 μ l/孔,室温固定 30min。

[0131] (4) 吸弃固定液,在吸水纸上轻轻拍干,PBS 洗涤 5min \times 3 次。

[0132] (5) 在吸水纸上轻轻拍干,滴加 3% H₂O₂,100 μ l/孔,室温孵育 20min,以阻断内源性过氧化物酶活性。

[0133] (6) 弃 H₂O₂,在吸水纸上轻轻拍干,PBS 洗涤 5min \times 3 次。

[0134] (7) 加入 Blocking buffer(3% BSA in 0.5% TBST),250 μ l/孔,室温封闭 2h。

[0135] (8) 吸去封闭液,0.1% TBST 洗涤 5 次,分别加入噬菌体单克隆,1 \times 10¹⁰PFU,

100 μ l/孔 (稀释于 0.2% TBST), 设 PBS 对照和原始噬菌体肽库单克隆对照, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5h, 间隔 20min 置脱色摇床缓慢振摇。

[0136] (9) 吸去噬菌体克隆, 在吸水纸上轻轻拍干, PBS 振荡洗涤 5min \times 5 次。

[0137] (10) 加入山羊抗 M13 多克隆抗体 (1 : 2000 稀释于 Blocking buffer), 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 并间隔 15min 放脱色摇床上缓慢振摇。

[0138] (11) 吸弃一抗, 在吸水纸上轻轻拍干, PBS 振荡洗涤 5min \times 5 次。

[0139] (12) 加入 HRP 标记兔抗山羊 IgG (1 : 8000 稀释于 Blocking buffer), 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 并间隔 15min 放脱色摇床上缓慢振摇。

[0140] (13) 吸弃二抗, 在吸水纸上轻轻拍干, PBS 振荡洗涤 5min \times 5 次。

[0141] (14) 在吸水纸上轻轻拍干, 加入现配 TMB 显色工作液, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 ~ 30min, 肉眼观察 (白色背景), 阳性孔应为蓝色或深蓝色, 阴性孔和对照孔应无色或淡蓝色。

[0142] (15) 加入显色终止液 (2M H₂SO₄) 终止反应, 50 μ l/孔, 立即用酶标仪于 450nm 波长下测 OD 值, 记录数据。

[0143] (16) 判定结果, 分析酶标测定仪取 $\lambda = 450\text{nm}$, $P/n \geq 2.1$ 时阳性, $P/n \leq 1.5$ 阴性, $1.5 \leq P/n \leq 2.1$ 可疑阳性。重复上述步骤 3 次, 3 次 ELISA 检测 $P/n \geq 2.1$ 的克隆为阳性克隆。 $P/n = \text{结肠癌 Caco-2 细胞孔 O.D 值} / \text{人胚肾 HEK293 细胞孔 O.D 值}$ (用空白孔校正 $T = 100\%$)。

[0144] (17) 接种结肠癌 Caco-2 细胞于 96 孔细胞培养板, 重复以上 ELISA 实验步骤, 进一步鉴定阳性克隆与结肠癌 Caco-2 细胞的结合活性, 排除假阳性克隆, 比较阳性克隆与 Caco-2 细胞亲和力, 每个克隆设 8 个复孔, 同时设 PBS 对照和无关克隆对照。

[0145] 2.2.5 阳性噬菌体克隆单链 DNA 快速纯化

[0146] (1) 按上述噬菌体扩增方法, 扩增阳性克隆, 在第一步离心后, 将 500 μ l 含噬菌体上清转入新无菌 1.5ml 离心管中。

[0147] (2) 加入 200 μ l PEG/NaCl, 反复颠倒混匀, 室温放置 10min。

[0148] (3) 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm, 离心 15min, 去上清, 再次短暂离心, 小心吸去残余上清。

[0149] (4) 沉淀物彻底重悬于 100 μ l 碘化物缓冲液中, 加入 250 μ l 无水乙醇。室温温育 10min。短时间的室温温育使 ssDNA 沉淀而大多数噬菌体蛋白保持在溶液中。

[0150] (5) 4 $^{\circ}$ C, 10000rpm, 离心 10min, 弃上清。用 70% 乙醇洗沉淀, 短暂真空干燥。

[0151] (6) 沉淀重悬于 30 μ l TE (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA) 中。

[0152] 2.2.6 噬菌体单链 DNA 测序

[0153] 取 5 μ l 噬菌体阳性克隆、噬菌体原库无关克隆对照和阴性克隆单链 DNA 作为模板, 稀释 -96gIII 测序引物: 5'-HOCCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3', 送南京金丝瑞生物工程公司全自动测序。根据噬菌体展示试剂盒说明书读序图, 利用 DNASTar 软件找到 EgaI I 酶切位点 CGGCCG 和 Kpn I 酶切位点 GGTACC, 十二肽序列即插入这两个酶切位点之间, 找出编码 Gly-Gly-Gly 的碱基序列 (GGT GGA GGT 或 CCA CCT CCA) 其上游 36 个碱基为编码十二肽的密码子, 按照十二肽库的设计原则, 每个密码子的第三位均为 G 或 T, 验证找到的碱基序列是否正确, 利用软件得出模板链的碱基序列, 按照试剂盒说明书提供的三联密码子图翻译成多肽序列 (参见图 2)。

[0154] 融合蛋白表达时 N 端有一段信号肽前导序列, 蛋白分泌后前导序列被切除, 使随机肽直接位于成熟蛋白的 N 末端, 下箭头指示前导序列的切割位点。-28 和 -96 引物的互补位置也在图中标出。

[0155] 参见图 3, 文库的随机序列区域仅用 32 个密码子编码所有 20 种氨基酸。这使单密码子氨基酸的出现频率相对较高, 同时排除了三个终止密码子中的两个。在构建该文库的菌株中, 琥珀终止子 TAG* 可被 Gln 抑制。

[0156] 2.2.7 阳性克隆氨基酸序列的同源性和特征分析

[0157] 将翻译的氨基酸序列通过 NCBI/BLAST 软件同数据库中蛋白质的氨基酸序列进行同源性分析, 将出现频率较高的序列用 ExPASy 提供的软件 ProtParam tools 来分析 12 肽片段的组成及特点, 利用 FASTA 工具来分析多肽序列的疏水性。

[0158] 2.2.8 细胞免疫荧光法鉴定阳性噬菌体克隆的靶向性

[0159] (1) 细胞爬片的准备:

[0160] ①将 24mm×24mm 盖玻片浸泡, 洗洁精清洗, 自来水冲洗, 稀盐酸浸泡 8h, 流水冲洗, 铬酸浸泡过夜, 流水冲洗, 蒸馏水、三蒸水冲洗三次, 置于玻璃培养皿中高压灭菌, 烘干备用;

[0161] ②在 6 孔细胞培养板中滴加少量细胞培养基, 用无菌操作, 夹取盖玻片, 放入培养板孔中, 使其贴附到孔底;

[0162] ③取生长状态良好的结肠癌 Caco-2 细胞和人胚肾 HEK293 细胞, PBS 冲洗一遍, 胰蛋白酶消化收集细胞, 细胞计数, 接种至 6 孔细胞培养板孔中的盖玻片上, 4×10^5 cells/ml, 1ml/well, 置于 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱, 培养 24h。

[0163] (2) 免疫荧光检测阳性噬菌体克隆的靶向性:

[0164] ①待 Caco-2 细胞和 HEK293 细胞培养至长满单层, 吸弃培养基, PBS 冲洗 3 次, 吸尽残留液体, 4% 多聚甲醛室温固定细胞, 30min;

[0165] ②用 PBS 洗涤 5min×3 次;

[0166] ③滴加 3% BSA 室温封闭 2h;

[0167] ④弃封闭液, 分别将展示 CCSP1 ~ 4 多肽的噬菌体阳性克隆滴加至细胞表面 (1×10^{10} PFU), 37°C 孵育 2h;

[0168] ⑤ PBS 洗涤 5min×5 次;

[0169] ⑥滴加抗 M13 多克隆抗体 (工作浓度 1 : 500), 37°C 孵育 2h;

[0170] ⑦ PBS 洗涤 5min×5 次;

[0171] ⑧滴加 FITC 标记兔抗山羊 IgG (工作浓度 1 : 100), 37°C 孵育 1h;

[0172] ⑨ PBS 洗涤 5min×3 次, 90% 缓冲甘油封片, 尼康 Ti-S 倒置显微镜镜检并拍照记录。

[0173] 2.2.9 统计学方法

[0174] 采用 SPSS 16.0-GLM 中的 Univariate 分析数据, 数据均以 ±SD 表示, 组间多重比较采用 Duncan 检验处理。P < 0.01 为差异极显著, P < 0.05 为差异显著, P > 0.05 为无统计学意义。

[0175] 三、实验结果

[0176] 3.1 噬菌体十二肽库 4 轮消减筛选

[0177] 本发明是从噬菌体随机十二肽库中筛选出与人结直肠癌细胞亲和力较高的噬菌体多肽,以人源结肠癌 Caco-2 细胞为靶细胞,以人胚肾细胞 HEK293 细胞为阴性吸附细胞,完成对噬菌体十二肽库 4 轮消减筛选,回收与结肠癌 Caco-2 细胞结合的噬菌体,重复对阴性细胞的消减筛选以排除非特异克隆。在筛选过程中,严格控制每轮筛选中加入噬菌体的数量,以保证筛选结果的稳定性。噬菌体原库的效价为 1.5×10^{13} pfu/ml,第一轮筛选投入噬菌体为 1.5×10^{11} pfu,回收噬菌体滴定后每轮尽量保证投入噬菌体量在 1.5×10^{10} pfu 以上(如表 3-1 和图 4 所示),通过 4 轮消减筛选,特异性克隆得到大量富集和扩增,为进一步挑取阳性克隆奠定良好的实验基础,提高了获得具有高亲和力噬菌体十二肽的可能性。

[0178] 表 3-1 四轮消减筛选中投入噬菌体量和回收噬菌体滴度

[0179]

Round of screening	Input phages (pfu)	Output phages (pfu/ml)
1	1.5×10^{11}	1.56×10^{13}
2	1.5×10^{10}	1.98×10^{13}
3	1.5×10^{10}	1.41×10^{13}
4	1.5×10^{10}	1.03×10^{13}

[0180] 3.2 细胞 ELISA 初步鉴定噬菌体阳性克隆

[0181] 第 4 轮消减筛选后不进行扩增,直接滴定,从约有 100 个蓝斑的 LB/IPTG/Xgal 平板上随机挑取 30 个噬菌体单克隆,感染宿主菌扩增、纯化并滴定,经细胞酶联免疫分析(ELISA)初步鉴定,依据噬菌体克隆与结肠癌 Caco-2 细胞结合情况,排除非特异性结合的克隆,以 PBS 为空白克隆对照,同时以原库单克隆为无关克隆对照(URPs),三次实验结果显示(表 3-1,表 3-2):OD450 值阳性细胞组(Caco-2 细胞)与阴性细胞组(HEK293 细胞)之比均大于 2.1 倍的克隆共有 10 个,分别是 Q16, Q22, Q23, Q24, Q25, Q26, Q27, Q28, Q29, Q30,它们能与结肠癌 Caco-2 细胞较好结合,与人胚肾 HEK293 细胞亲和力较弱或不结合,无关克隆对照和 PBS 空白克隆对照组蓝色较弱或无色,初步确定此 10 个克隆为阳性克隆。利用 ELISA 法,对 10 个噬菌体阳性克隆在 Caco-2 细胞上的结合特异性进行反复鉴定(图 4),对 ELISA 数据结果进行统计学分析,显示 10 个阳性克隆与 Caco-2 细胞的亲和力均显著高于无关克隆对照组和 PBS 对照组($P < 0.01$),其中 Q29 号克隆与 Caco-2 细胞结合的 OD450 值最高,较其他克隆组差异显著($P < 0.05$),其靶向性有待进一步研究。

[0182] 表 3-2ELISA 鉴定噬菌体单克隆与 Caco-2 细胞的结合力

[0183]

Clone NO.	Fold Rise of ELISA Value		
1	1.72	1.52	1.70
2	1.67	1.34	1.70
3	1.51	1.25	1.09
4	1.84	1.33	1.34
5	1.88	1.29	2.80
6	1.69	1.44	2.27
7	1.63	1.30	1.77
8	1.81	1.30	1.37
9	1.25	1.30	1.35
10	1.50	1.43	1.41
11	1.58	1.80	6.83
12	1.98	2.27	11.88
13	1.92	2.00	7.86

[0184]

14	1.88	1.74	11.74
15	1.66	1.28	6.19
16	2.12	2.43	13.11
17	1.64	1.47	10.01
18	1.64	1.65	5.08
19	1.22	1.73	4.21
20	1.85	1.50	8.50
21	1.77	2.80	12.93
22	2.30	3.10	6.08
23	2.90	3.14	5.58
24	2.55	3.40	94.80
25	2.36	2.37	6.85
26	2.41	2.76	11.66
27	2.63	2.32	50.11
28	2.16	2.54	10.49
29	2.74	3.11	6.79
30	3.30	2.31	8.48

[0185] 表 3-3ELISA 鉴定阳性克隆与 Caco-2 细胞的亲和力

[0186]

Clone NO.	ELISA value at 450nm								Mean	Std. Deviation
16**	1.081	1.038	1.100	0.940	0.857	0.766	0.901	0.864	0.94338	0.119197
22**	0.997	1.025	0.778	0.946	0.830	0.961	0.898	0.791	0.90325	0.094457
23**	1.045	1.095	0.782	0.919	1.029	0.911	1.036	0.888	0.96312	0.104785
24**	0.907	0.850	0.771	0.910	0.780	1.100	0.913	0.731	0.87025	0.116704
25**	0.886	0.973	0.954	0.850	0.915	0.851	0.784	0.856	0.88362	0.061891
26**	0.777	0.703	0.956	0.972	1.011	1.019	0.810	0.946	0.89925	0.118895
27**	1.025	0.864	0.852	0.888	0.866	0.978	0.825	0.909	0.90088	0.067938
28**	0.899	0.926	0.898	0.884	0.996	0.967	1.032	0.910	0.93900	0.053450
29**	1.008	0.971	0.935	1.034	0.947	0.969	0.937	0.940	0.96763	0.036332
30**	0.755	0.988	0.885	0.897	0.896	0.968	0.729	0.674	0.84900	0.115358
URPs#	0.014	0.029	0.035	0.033	0.023	0.038	0.039	0.030	0.02262	0.001598
PBS	0.022	0.022	0.021	0.023	0.025	0.021	0.025	0.022	0.03013	0.008323

[0187] ** :P < 0.01 与 PBS 对照组和噬菌体无关克隆 (URPs) 对照组比较。

[0188] # :P > 0.05 与 PBS 对照组比较。

[0189] 3.3 噬菌体阳性克隆的测序结果及分析

[0190] 3.3.1 测序结果

[0191] 对于细胞 ELISA 鉴定获得的噬菌体阳性克隆、噬菌体原库无关克隆对照和亲和力较弱的噬菌体克隆进行 DNA 测序,按照噬菌体展示试剂盒说明书提供的 ssDNA 提取方法,提取的噬菌体单链 DNA 测序后得到的是其互补碱基序列,利用 DNASTar 软件按照碱基互补配对原则转化为反向互补序列,按照噬菌体肽库使用说明书测序分析方法,噬菌体插入片段位于 KpnI 酶切位点 GGTACC 和 Eag I 酶切位点 CGGCCG 之间,即 5'-(Kpn I)G GTA CCT TTC TATTCT CAC TCT NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK GGT GGA GGT TCG GCC G(Eag I)-3',其中第三位碱基K为G或T,其后面是一段间隔多肽,由 Gly-Gly-Gly-Ser 组成,找到插入序列并按照说明书中的遗传密码表推导出相应的氨基酸序列,测序结果如下:

[0192] (1) 噬菌体克隆 :Q16, Q23, Q25 和 Q30

[0193] ACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGGGATTTTGCTAAACAACCTTCAACAGTTTCGGCCGAACCTCCA
 CCACCCAACCGAGAATAACGAGTATCAATCGACGGACTAGAGTGAGAATAGAAAGGTACCACTAAAGGAATTGCGAA
 TAATAATTTTTTACGTTGAAAATCTCCAAAAAAAAGGCTCCAAAAGGAGCCTTTAATTGTATCGGTTTATCAGCTT
 GCTTTCGAGGTGAATTTCTTAAACAGCTTGATACCGATAGTTGCGCCGACAATGACAACAACCATCGCCCACGCATA
 ACCGATATATTCGGTCGCTGAGGCTTGACAGGGAGTTAAAGGCCGCTTTTTCGCGGATCGTCACCCTCAGCAGCGAAAG
 ACAGCATCGGAACGAGGGTAGCAACGGCTACAGAGGCTTTGAGGACTAAAGACTTTTTTCATGAGGAAGTTTCCATTA
 AACGGGTAAAATACGTAATGCCACTACGAAGGCACCAACCTAAAACGAAAGAGGCAAAAAGAATACACTAAAACACTC
 ATCTTTGACCCCGAGGATTATACCAAGCGCGAAAACAAAGTACAACGGAGATTTGTATCATCGCCTGATAAATTGTG
 TCGAAATCCGCGACCTGCTCCATGTTACTTAGCCGGAACGAGGCGCAGACGGTCAATCATAAGGGAACCGAAGTAC
 CAACTTTGAAAGAGGACAGATGAACGGTGTACAGACCAGGCGCATAGGCTGGCTGACCTTCATCAAGAGTAATCTTG
 ACAAGAACCGGATATTCATTACCCAAATCAACGTAACAAAGCTGCTCATTTCAGTGAATAAGGCTTGCCCTGACGAGA

AACACCAGAACGAGTAGTAAATTTGGGCTTGAGATGGTTTATTTCAACTTTAATCATTGTGATTACCTTATGCGATT
TAAGAACTGGCTCATTATAACCAGCCAGGACGTTGGGAAGAAAAATCTACGTTATAAATCGAACTAACGGAACAACAT
TATTACCAGGTAGAAAGAATCCATCACGTTGAGATTT

[0194] 两标志性酶切位点之间序列：

[0195] AACCTCCACCACCCAACCGAGAATAACGAGTATCAATCGACGGACTAGAGTGAGAATAGAAA

[0196] 反向互补序列：

[0197] TTTCTATTCTCACTCTAGTCCGTCGATTGATACTCGTTATTCTCGGTTGGGTGGAGGTT

[0198] 12 肽碱基序列：AGTCCGTCGATTGATACTCGTTATTCTCGGTTGGGT

[0199] 12 肽序列：SPSIDTRYSRLG

[0200] (2) 噬菌体克隆：Q24

[0201] GACGTTAGTAaATGAATTTTCTGTATGGGATTTTGCTAAACAACCTTTCAACAGTTTCGGCCGAACCTCC
ACCAGGCCTAGGACTCGGCTTCATACCCACAGAAAACAAGAGTGAGAATAGAAAGGTACCACTAAAGGAATTGCGA
ATAATAATTTTTTACGTTGAAAATCTCCAAAAAAAAGGCTCCAAAAGGAGCCTTTAATTGTATCGGTTTATCAGCT
TGCTTTTCGAGGTGAATTTCTTAAACAGCTTGATACCGATAGTTGCGCCGACAATGACAACAACCATCGCCACGCAT
AACCGATATATTCGGTCGCTGAGGCTTGACAGGGAGTTAAAGGCCGCTTTTGCGGGATCGTCACCCTCAGCAGCGAAA
GACAGCATCGGAACGAGGGTAGCAACGGCTACAGAGGCTTTGAGGACTAAAGACTTTTTTCATGAGGAAGTTTCCATT
AAACGGGTAAAATACGTAATGCCACTACGAAGGCACCAACCTAAAACGAAAGAGGCAAAAAGAATACACTAAAACACT
CATCTTTGACCCCGAGGATTATACCAAGCGCGAAAACAAGTACAACGGAGATTTGTATCATCGCCTGATAAATTGT
GTGCAAAATCCGCGACCTGCTCCATGTTACTTAGCCGAAACGAGGCGCAGACGGTCAATCATAAGGGAACCGAACTGA
CCAACCTTTGAAAGAGGACAGATGAACGGGTACAGACCAGGCGCATAGGCTGGCTGACCTTCATCAAGAGTAATCTT
GACAAGAACCGGATATTCATTACCCAAATCAACGTAACAAAAGCTGCTCATTTCAGTGAATAAAGCTTGCCCTGACGAG
AAACACCAGAACGAGTAGTAAATTTGGGCTTGAGATGGTTAATTTCAACTTTAATCATTGTGAATTACCTTATGCGA
TTTTAAGAACTGGCTCATTATAACCAGTCAGA CGTTGGGAAGAAAAATCTACGTTAATAAAACGAACTAACGGAACA
ACATTATTACAGGTAGAAAGATC

[0202] 两标志性酶切位点之间序列：

[0203] AACCTCCACCAGGCTAGGACTCGGCTTCATACCCACAGAAAACAAGAGTGAGAATAGAAA

[0204] 反向互补序列：

[0205] TTTCTATTCTCACTCTTGTGTTTCTGTGGGTATGAAGCCGAGTCCTAGGCCTGGTGGAGGTT

[0206] 12 肽碱基序列：TGTGTTTCTGTGGGTATGAAGCCGAGTCCTAGGCCT

[0207] 12 肽序列：CVSVGMKPSRP

[0208] (3) 噬菌体克隆：Q26, Q29

[0209] GTTAGTAaATGAATTTTCTGTATGGGATTTTGCTAAACAACCTTTCAACAGTTTCGGCCGAACCTCCACC
AGGCCTAGGACTCGGCTTCATACCCACAGAAAACAAGAGTGAGAATAGAAAGGTACCACTAAAGGAATTGCGAATA
ATAATTTTTTACGTTGAAAATCTCCAAAAAAAAGGCTCCAAAAGGAGCCTTTAATTGTATCGGTTTATCAGCTTGC
TTTCGAGGTGAATTTCTTAAACAGCTTGATACCGATAGTTGCGCCGACAATGACAACAACCATCGCCACGCATAAC
CGATATATTCGGTCGCTGAGGCTTGACAGGGAGTTAAAGGCCGCTTTTGCGGGATCGTCACCCTCAGCAGCGAAAGAC
AGCATCGGAACGAGGGTAGCAACGGCTACAGAGGCTTTGAGGACTAAAGACTTTTTTCATGAGGAAGTTTCCATTA
CGGGTAAAATACGTAATGCCACTACGAAGGCACCAACCTAAAACGAAAGAGGCAAAAAGAATACACTAAAACACTCAT
CTTTGACCCCGAGGATTATACCAAGCGCGAAAACAAGTACAACGGAGATTTGTATCATCGCCTGATAAATTGTGTC

GAAATCCGCGACCTGCTCCATGTTACTTAGCCGGAACGAGGCGCAGACGGTCAATCATAAGGGAACCGAACTGACCA
 ACTTTGAAAGAGGACAGATGAACGGTGTACAGACCAGGCGCATAGGCTGGCTGACCTTCATCAAGAGTAATCTTGAC
 AAGAACCGGATATTCATTACCCAAATCAACGTAACAAAGCTGCTCATTTCAGTGAATAA_gGCTTGCCCTGACGAGAAA
 CACCAGAACGAGTAGTAAATTGGGCTTGAGATGGTTAATTTCAACTTTAATCATTGTGAATTACCTTATGCGATTT
 TAAGAAGTGGCTCATTATACCAGTCAGGACGTTGGGAAGAAAAATCTACGTTAATAAACGAACTAACGGACACATTA
 TACAGTAGAAGATTCATCAGTGAGATTAGATACACATCACTATGCAGATAATAACGCAAAGATTACGAGGCATAGT
 AAGAGCACACTATTATACCTCGTTTACCAG

[0210] 两标志性酶切位点之间序列：

[0211] AACCTCCACCAGGCTAGGACTCGGCTTCATACCCACAGAAACAGAAGAGTGAGAATAGAAA

[0212] 反向互补序列：

[0213] TTTCTATTCTCACTCTTCTGTTTCTGTGGGTATGAAGCCGAGTCTTAGGCCCTGGTGGAGGTT

[0214] 12 肽碱基序列：TCTGTTTCTGTGGGTATGAAGCCGAGTCTTAGGCCCT

[0215] 12 肽序列：SVSVGMKPSRP

[0216] (4) 噬菌体克隆：Q28

[0217] GTTAGTAATGAATTTTCTGTATGGGATTTTGTCTAAACAACCTTTCAACAGTTTCGGCCGATCCTCCACC
 CAGCCTATCCCGCGGAGAAGAATCCATCGAAACCATAGAGTGAGAATAGAAAAGTACCACTAAAGGAATTGCGAAT
 AATAATTTTTTTCAGTTGAAAATCTCCAAAAAAAAGGCTCCAAAAGGAGCCTTTAATTGTATCGGTTTATCAGCT
 TGCTTTCGAGGTGAATTTCTTAAACAGCTTGATACCGATAGTTGCGCCGACAATGACAACAACCATCGCCCACGC
 ATAACCGATATATTCGGTCGCTGAGGCTTGCAAGGAGTTAAAGGCCGCTTTTTCGCGGATCGTCACCCTCAGCAGC
 GAAAGACAGCATCGGAACGAGGGTAGCAACGGCTACAGAGGCTTTGAGGACTAAAGACTTTTTCATGAGGAAGTT
 TCCATTAACGGGTAAAATACGTAATGCC ACTACGAAGGCACCAACCTAAAACGAAAGAGGCAAAAGAATACACTA
 AAACACTCATCTTTGACCCCCAGCGATTATACCAAGCGCGAAACAAAGTACAACGGAGATTTGTATCATCGCCTGAT
 AAATTGTGTCGAAATCCGCGACCTGCTCCATGTTACTTAGCCGGAACGAGGCGCAGACGGTCAATCATAAGGGAACC
 GAACTGACCAACTTTGAAAGAGGACAGATGAACGGTGTACAGACCAGGCGCATAGGCTGGCTGACCTTCATCAAGAG
 TAATCTTGACAAGAACCGGATATTCATTACCCAAATCAACGTAACAAAGCTGCTCATTTCAGTGAATAAGGCTTGCC
 TGACGAGAAACACCAGAACGAGTAGTAAATTGGGCTTGAGATGGTTAATTTCAACTTTAATCATTGTGAATTACCT
 TTATGCGATTTTAAAGAACTGGCTCATTATACCAGTCAGGACGTTGGGAAGAAAAATCTACGTTTCATAAACGAACTAA
 CGGAACACATTATTACAGGTAGAAAGATTCATCAGTTGAGATTTAGGATACACATTCAACTATGCAGATACATAACG
 CAAAGTATTACGAGGCATAGTAGAGCCACACTATCATAACCCTCGTTTACCAGACGAACGATAAAAAACCA

[0218] 两标志性酶切位点之间序列：

[0219] ATCCTCCACCCAGCCTATCCCGCGGAGAAGAATCCATCGAAACCATAGAGTGAGAATAGAAA

[0220] 反向互补序列：

[0221] TTTCTATTCTCACTCTATGGTTTCGATGGATTCTTCTCCGCGGGATAGGCTGGGTGGAGGAT

[0222] 12 肽碱基序列：ATGGTTTCGATGGATTCTTCTCCGCGGGATAGGCTG

[0223] 12 肽序列：MVSMDSSPRDL

[0224] (5) 噬菌体无关克隆对照：

[0225] ACGTTAGTAATGAATTTTCTGTATGGGATTTTGTCTAAACAACCTTTCAACAGTTTCGGCCGAACCTCCAC
 CATCCCTAGAATACGCCGTCCAGTAGTATCATGCTCAGAGTGAGAATAGAAAAGTACCACTAAAGGAATTGCGAAT
 AATAATTTTTTTCAGTTGAAAATCTCCAAAAAAAAGGCTCCAAAAGGAGCCTTTAATTGTATCGGTTTATCAGCTTG

CTTTCGAGGTGAATTTCTTAAACAGCTTGATACCGATAGTTGCGCCGACAATGACAACAACCATCGCCCACGCATAA
 CCGATATATTCGGTCGCTGAGGCTTGCAGGGAGTTAAAGGCCGCTTTTGCGGGATCGTCACCCTCAGCAGCGAAAAGA
 CAGCATCGGAACGAGGGTAGCAACGGCTACAGAGGCTTTGAGGACTAAAGACTTTTTTCATGAGGAAGTTTCCATTAA
 ACGGGTAAAATACGTAATGCCACTACGAAGGCACCAACCTAAAACGAAAGAGGCAAAAGAATACACTAAAACACTCA
 TCTTTGACCCCCAGCGATTATACCAAGCGCGAAAACAAAGTACAACGGAGATTTGTATCATCGCCTGATAAATTGTGT
 CGAAATCCGCGACCTGCTCCATGTTACTTAGCCGGAACGAGGCGCAGACGGTCAATCATAAGGGAACCGAACTGACC
 AACTTTGAAAGAGGACAGATGAACGGTGTACAGACCAGGCGCATAGGCTGGCTGACCTTCATCAAGAGTAATCTTGA
 CAAGAACCGGATATTCATTACCCAAATCAACGTAACAAAGCTGCTCATTCAAGTGAATAgGCTTGCCCTGACGAGAAA
 CACCAGAACGAGTAGTAAATTGGGCTTGAGATGGTTTAAATTTCAACTTTAATCATTGTGAATTACCTTATGCGATTT
 TAAGAACTGGCTCATTATACCAGTCAGGACGTTGGGAAGAAAACTACGTTAATAAACGAACTAACGGAACAACATT
 ATTACAGGTAGAAAGATTCATCAGTTGAGATTTAGGATACCACATTCAACTATGCAGATACATAACGCCAAAGTATT
 ACGAGCATAGTAGACACACTATCATACCCTCGTTTACAGACGACGATAAAACAAATAGCGGAGAGGCCTTTGCAAG
 AAGTTTTGCCGAAGGGGGGTATAG

[0226] 两标志性酶切位点之间序列：

[0227] AACCTCCACCATCCCTAGAATACGCCGTCAGTAGTATCATGCTCAGAGTGAGAATAGAAA

[0228] 反向互补序列：

[0229] TTTCTATTCTCACTCTGAGCATGATACTACTGGGACGGCGTATTCTAGGGATGGTGGAGGTT

[0230] 12 肽碱基序列：GAGCATGATACTACTGGGACGGCGTATTCTAGGGAT

[0231] 12 肽序列：EHDTTGTAYSRD

[0232] (6) 阴性噬菌体克隆：Q3

[0233] GACGTTAGTAaATGAATTTTCTGTATGGGATTTTGCATAACAACCTTTCAACAGTTTCGGCCGAACCTCC
 ACCACGCCTAGGACAATAACTACAAAACCTCGACGGACAAGAGTGAGAATAGAAAGGTACCACTAAAGGAATTGCGA
 ATAATAATTTTTTTCACGTTGAAAATCTCCAAAAAAAAGGCTCCAAAAGGAGCCTTTAATTGTATCGGTTTATCAGCT
 TGCTTTTCGAGGTGAATTTCTTAAACAGCTTGATACCGATAGTTGCGCCGACAATGACAACAACCATCGCCCACGCAT
 AACCGATATATTCGGTCGCTGAGGCTTGCAGGGAGTTAAAGGCCGCTTTTGCGGGATCGTCACCCTCAGCAGCGAAA
 GACAGCATCGGAACGAGGGTAGCAACGGCTACAGAGGCTTTGAGGACTAAAGACTTTTTTCATGAGGAAGTTTCCATT
 AAACGGGTAAAATACGTAATGCCACTACGAAGGCACCAACCTAAAACGAAAGAGGCAAAAGAATACACTAAAACACT
 CATCTTTGACCCCCAGCGATTATACCAAGCGCGAAAACAAAGTACAACGGAGATTTGTATCATCGCCTGATAAATTGT
 GTCGAAATCCGCGACCTGCTCCATGTTACTTAGCCGGAACGAGGCGCAGACGGTCAATCATAAGGGAACCGAACTGA
 CCAACTTTGAAAGAGGACAGATGAACGGTGTACAGACCAGGCGCATAGGCTGGCTGACCTTCATCAAGAGTAATCTT
 GACAAGAACCGGATATTCATTACCCAAATCAACGTAACAAAGCTGCTCATTCAAGTGAATAAGGCTTGCCCTGACGAG
 AAACACCAGAACGAGTAGTAAATTGGGCTTGAGATGGTTTAAATTTCAACTTTAATCATTGTGAATTACCTTATGCGA
 TTTTAAGAACTGGCTCATTATACCAGTCAGACGTTGGGAAGAAAACTACGTTAATAAACGACTAACGGACACATT
 ATTACAGTAGAAGATTCATCAGTGAGATTAGATACACATTCCTATGCAGATACATACGCCAAAAGATTACGAGGCA
 TAGTAGAGCACACTATTCATA

[0234] 两标志性酶切位点之间序列：

[0235] AACCTCCACACGCTAGGACAATAACTACAAAACCTCGACGGACAAGAGTGAGAATAGAAA

[0236] 反向互补序列：

[0237] TTTCTATTCTCACTCTTGTCCGTCGAGGGTTTGTAGTTATTGTCTAGGCGTGGTGGAGGTT

- [0238] 12 肽碱基序列 :TGTCCGTCGAGGGTTGTAGTTATTGTCCTAGGCGT
- [0239] 12 肽序列 :CPSRVCSYCP RR
- [0240] (7) 阴性噬菌体克隆 :Q9
- [0241] AGACGTTAGTAaATGAATTTTCTGTATGGGATTTTGCTAAACAAC TTTCAACAGTTTCGGCCGAACCTC
CACCACGCAACCGACAATAACTAGTACCCTCGACGGACAAAGAGTGAGAATAGAAAGGTACCACTAAAGGAATTGCG
AATAATAATTTTTTTCACGTTGAAAAATCTCCAAAAAAAAGGCTCCAAAAGGAGCCTTTAATTGTATCGGTTTATCAGC
TTGCTTTTCGAGGTGAATTTCTTAAACAGCTTGATACCGATAGTTGCGCCGACAATGACAACAACCATCGCCCACGCA
TAACCGATATATTCGGTCGCTGAGGCTTGACAGGGAGTTAAAGGCCGCTTTTTCGGGATCGTCACCCTCAGCAGCGAA
AGACAGCATCGGAACGAGGGTAGCAACGGCTACAGAGGCTTTGAGGACTAAAGACTTTTTTCATGAGGAAGTTTCCAT
TAAACGGGTAAAATACGTAATGCCACTACGAAGGCACCAACCTAAAACGAAAGAGGCAAAAAGAATACACTAAAACAC
TCATCTTTGACCCCGAGCGATTATACCAAGCGCGAAAACAAAGTACAACGGAGATTTGTATCATCGCCTGATAAATTG
TGTCGAAATCCGCGACCTGCTCCATGTTACTTAGCCGGAACGAGGCGCAGACGGTCAATCATAAGGGAACCGAACTG
ACCAACTTTGAAAGAGGACAGATGAACGGTGTACAGACCAGGCGCATAGGCTGGCTGACCTTCATCAAGAGTAATCT
TGACAAGAACCGGATATTCATTACCCAAAATCAACGTAACAAAGCTGCTCATTTCAGTGAATAACGCTTGCCCTGACGA
GAAACACCAGAACGAGTAGTAAATTGGGCTTGAGATGGTTTAAATTTCAACTTTAATCATTGTGAATTACCTTATGCG
ATTTTAAGAACTGGCTCATTATACCAGTCAG ACGTTGGGAAGAAAATCTACGTTAATAAAACGAACTAACGGACAC
ATTATTACAGTAGAAGATTCATCAGTGAGATTAGATACCACATTCAC TAATGCAGATAATAACGCCAAAGGATTACG
AGGCATAGTAG
- [0242] 两标志性酶切位点之间序列 :
- [0243] AACCTCCACCACGCAACCGACAATAACTAGTACCCTCGACGGACAAAGAGTGAGAATAGAAA
- [0244] 反向互补序列 :
- [0245] TTTCTATTCTCACTCTTTGTCCGTCGAGGGTACTAGTTATTGTCGGTTGCGTGGTGGAGGTT
- [0246] 12 肽碱基序列 :TTGTCCGTCGAGGGTACTAGTTATTGTCGGTTGCGT
- [0247] 12 肽序列 :LSVEGTSYCRLR
- [0248] 表 3-4 :噬菌体阳性克隆测序
- [0249]

Phage clones	DNA sequence	Peptide sequence
Q16, Q23, Q25, Q30	AGTCCGTCGATTGATACTCGTTATTCTCGGTTGGGT	SPSIDTRY SRLG
Q24	TGTGTTTCTGTGGGTATGAAGCCGAGTCTAGGCCT	CVSVGMKPSRP
Q26, Q29	TCTGTTTCTGTGGGTATGAAGCCGAGTCTAGGCCT	SVSVGMKPSRP
Q28	ATGGTTTCGATGGATTCTTCTCCGCGGATAGGCTG	MVSMDS SPRDL
URPs	GAGCATGATACTACTGGGACGGCTATTCTAGGGAT	EHD TTGTAYS RD
Q3	TGTCCGTCGAGGGTTGTAGTTATTGTCCTAGGCGT	CPSRVCSYCP RR
Q9	TTGTCCGTCGAGGGTACTAGTTATTGTCGGTTGCGT	LSVEGTSYCRLR

[0250] 测序结果如表 3-4 显示,15 个测序样本中有 11 个噬菌体克隆测序正确、含有外源插入的随机序列,并在随机区域内含有编码十二肽的 36 个碱基,且每一密码子第三位碱基为 G 或 T,符合噬菌体随机肽库的构建原则,结果显示与结直肠癌细胞结合的噬菌体克隆中,Q16, Q23, Q25 和 Q30 这四个克隆的序列为 SPSIDTRY SRLG ;Q24 克隆的序列为 CVSVGMKPSRP ;Q26 和 Q29 两个克隆序列为 SVSVGMKPSRP ;Q28 克隆的序列为 MVSMDS SPRDL ;噬菌体原库无关克隆对照序列为 EHD TTGTAYS RD ;两个亲和力较低的克隆序列为 PSRVCSYCP RR、LSVEGTSYCRLR。

[0251] 3.3.2 氨基酸序列同源性分析

[0252] 3.3.2.1 四种氨基酸序列之间的同源性分析

[0253] 将4条结直肠癌 Caco-2 细胞特异性多肽 (Colorectal Carcinoma Specific Peptide)-SPSIDTRYSLG-、-CVSVGMPKSPRP-、-SVSVGMPKSPRP-、-MVSMDSSPRDRL- 分别命名为 CCSP1、CCSP2、CCSP3、CCSP4, 序列之间有不同程度的重复序列, 登录 EMBL EBI 网站 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align>), 比较四种多肽片段之间的同源性 (表 4-5)。将四条多肽序列编辑为 FASTA 格式, 采用 Clustal X1.83 软件分析, Load 序列, 选择 DoComplete Alignment 菜单, 寻找保守氨基酸位点。通过 BioEdit 软件分析四条多肽序列的共有基序 (Motif Sequence), 输出序列比对结果如下:

[0254] 表 3-5: 四种插入片段的氨基酸序列对比结果

[0255]

Sequence Name	Len(aa)	Sequence Name	Len(aa)	Score(%)
CCSP1	12	CCSP2	12	7.0
CCSP1	12	CCSP3	12	7.0
CCSP1	12	CCSP4	12	7.0
CCSP2	12	CCSP3	12	57.0
CCSP2	12	CCSP4	12	21.0

[0256]

CCSP3	12	CCSP4	12	21.0
-------	----	-------	----	------

[0257] 注: Len 表示多肽长度; Score 表示同源性程度。

[0258] 表 3-6: Clustal X 多序列比对

[0259]

Peptide Name	Peptide Sequence
CCSP1	SPSIDTR-YSRLG
CCSP2	CVSVGMPKSPRP-
CCSP3	SVSVGMPKSPRP-
CCSP4	MVSMDSSPRDRL-
Consensus site	**
Motif Sequence	XXSXXXXXXXXXX

[0260] 4.3.2.2 与数据库已知蛋白质氨基酸序列的同源性分析

[0261] 登陆 NCBI/BLAST 网站 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 选择 Basic BLAST 菜单下的 protein blast, 输入多肽序列, 选择 Non-redundant protein sequences(nr) 数据库, 限定为人源性 (Homo sapiens), Program Selection 选择 blastp (protein-protein BLAST), 将这4个十二肽序列分别与数据库中已知蛋白质氨基酸序列进行同源性分析。在噬菌体展示多肽库与结直肠癌细胞孵育过程中, 对多肽与癌细胞表面受体或配体的结合起决定作用的可能是多肽全部氨基酸或者若干个关键性的氨基酸基序如丝氨酸、脯氨酸和精氨酸等。因此将上述四条多肽序列与蛋白质数据库中已知蛋白相比较, 结果发现它们与一些已知的蛋白质或多肽具有同源性, CCSP1 与 immunoglobulin superfamily member 8 等蛋白同源性较高; CCSP2 与 Death-inducer obliterator 1 和 Microtubule-associated protein 9 等蛋白具有较高同源性; CCSP3 多肽与 Death inducer-obliterator-3 等蛋白同源性较高; CCSP4 多肽与 cadherin EGF LAGseven-pass G-type receptor 3 precursor 等同源性较高。

[0262] 表 3-7: 十二肽 CCSP1 序列与蛋白质数据库的对比结果

[0263]

Accession	Description	Subject sequence	Max score	Total score	Query coverage	E value	Identities
EAW77758.1	Hypothetical protein MGC4562, isoform CRA_a [Homo sapiens]	IDTRY5	23.1	23.1	50%	90	6/6 (100%)
AAH04108.2	IGSF8 protein [Homo sapiens]	PSTDTRY--LG	23.1	23.1	91%	90	8/11 (72%)
AAM94901.1	LIR-D1 precursor [Homo sapiens]	PSTDTRY--LG	23.1	23.1	91%	90	8/11 (72%)
CAI15270.1	immunoglobulin superfamily, member 8 [Homo sapiens]	PSTDTRY--LG	23.1	23.1	91%	90	8/11 (72%)
NP_443100.1	immunoglobulin superfamily member 8 [Homo sapiens]	PSTDTRY--LG	23.1	23.1	91%	90	8/11 (72%)
EAX02779.1	hCG1797565 isoform CRA_c [Homo sapiens]	PSIDIRY	22.7	22.7	58%	121	6/7 (85%)

[0264]

EAX02778.1	hCG1797565 isoform CRA_b [Homo sapiens]	PSIDIRY	22.7	22.7	58%	121	6/7 (85%)
NP_116755.1	protocadherin-11 Y-linked isoform c [Homo sapiens]	PSIDIRY	22.7	22.7	58%	121	6/7 (85%)
AAK82656.1	protocadherin-S [Homo sapiens]	PSIDIRY	22.7	22.7	58%	121	6/7 (85%)
AAL55729.1	protocadherin-PC [Homo sapiens]	PSIDIRY	22.7	22.7	58%	121	6/7 (85%)
CAD92413.1	protocadherin [Homo sapiens]	PSIDIRY	22.7	22.7	58%	121	6/7 (85%)
3FGA_C	Chain C, Structural Basis Of Pp2a And Sgo Interaction	SPSIDT	21.4	21.4	50%	292	6/6 (100%)
3C5W_C	Chain C, Complex Between Pp2a-Specific Methylesterase Pme-1 And Pp2a Core Enzyme	SPSIDT	21.4	21.4	50%	292	6/6 (100%)
CAG33698.1	PPP2CA [Homo sapiens]	SPSIDT	21.4	21.4	50%	292	6/6 (100%)
AAL35904.1	protein phosphatase type 2A catalytic subunit [Homo sapiens]	SPSIDT	21.4	21.4	50%	292	6/6 (100%)
AAB38020.1	phosphatase 2A [Homo sapiens]	SPSIDT	21.4	21.4	50%	292	6/6 (100%)
NP_001009552.1	serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform [Homo sapiens]	SPSIDT	21.4	21.4	50%	292	6/6 (100%)
ADA54854.1	immunoglobulin M heavy chain variable region [Homo sapiens]	DTRYIS	19.7	19.7	41%	945	5/5 (100%)

[0265] 注 :score 是打分矩阵计算出来的值,值越大说明所检索的序列跟目标序列匹配程度越大 ;Evalue 表示序列被随机搜索出来的概率 ;Identities 是相似程度,表示输入序列和数据库中序列的匹配程度 ;Query coverage 是序列覆盖度。

[0266] 表 3-8 :十二肽 CCSP2 序列与蛋白质数据库的对比结果

[0267]

Accession	Description	Subject sequence	Max score	Total score	Query coverage	E value	Identities
EAW75324.1	death inducer-obliator 1, isoform CRA_c [Homo sapiens]	MKPGPRP	23.5	23.5	58%	67	6/7 (85%)

[0268]

AAS49899.1	death inducer-obliterator-3 [Homo sapiens]	MKPGPRP;	23.5	56.2	75%	67	6/7 (85%)
T42664	hypothetical protein [Homo sapiens]	MKPGPRP	23.5	23.5	58%	67	6/7 (85%)
AAI46865.1	Microtubule-associated protein 9 [Homo sapiens]	KPSRP	22.3	41.6	58%	162	6/6 (100%)
BAH02310.1	nuclear receptor subfamily 5, group A [Homo sapiens]	CLSVGMPK	22.3	22.3	58%	162	6/7 (85%)
AAH22852.1	MAP9 protein [Homo sapiens]	KPSRP	22.3	41.6	58%	162	6/6 (100%)
AAM77350.1	LIMS2[Homo sapiens]	KPSRP	22.3	22.3	50%	162	6/6 (100%)
2A66_A	Chain A, Human Liver Receptor Homologue Dna-Binding Domain (Hlrh-1Dbd) In Complex With Dsdna From The Hcyp7a1 Promoter	CLSVGMPK	22.3	22.3	58%	162	6/7 (85%)
BAB61903.2	KIAA1773 protein [Homo sapiens]	GMK-SPRP	21.8	21.8	66%	217	7/8 (87%)
NP_001140174.1	lysine-specific demethylase 5C isoform 2 [Homo sapiens]	KPSP	21.4	36.9	100%	292	4/4 (100%)
CAA72402.1	collagen type XIV [Homo sapiens]	VSIGSKPSAR	21.4	21.4	83%	292	7/10 (70%)
NP_036440.1	lysine-specific demethylase 2A [Homo sapiens]	MKPAPR	21.0	21.0	50%	391	5/6 (83%)
AAH28694.1	Tudor domain containing 7 [Homo sapiens]	SVGKKPNPAP	20.6	38.2	83%	525	7/10 (70%)
2V4U_A	Chain A, Human Ctp Synthetase 2 - Glutaminase Domain	MKPSP	20.2	20.2	41%	704	5/5 (100%)
BAF94481.1	T cell receptor alpha variable 38[Homo sapiens]	MKPGPR	20.2	20.2	50%	704	5/6 (83%)
2AF0_A	Chain A, Structure Of The Regulator Of G-Protein Signaling	MKPSP	20.2	20.2	41%	704	5/5 (100%)

[0269]

	Domain Of Rgs2						
--	----------------	--	--	--	--	--	--

[0270] 表 3-9 : 十二肽 CCSP3 序列与蛋白质数据库的对比结果

[0271]

Accession	Description	Subject sequence	Max score	Total score	Query coverage	E value	Identities
EAW75324.1	Death inducer-obliterator 1, isoform CRA_c [Homo sapiens]	MKPGPRP	23.5	56.2	75%	67	6/7 (85%)
AAS49899.1	death inducer-obliterator-3 [Homo sapiens]	MKPGPRP	23.5	56.2	75%	67	6/7 (85%)
AAI51838.1	MLL3 protein [Homo sapiens]	SVSVDM---P RP KPSPR SVSV	22.7	55.8	100%	121	8/12 (66%) 5/5 (100%) 4/4 (100%)
EAW53971.1	hCG1990594, isoform CRA_a [Homo sapiens]	SVSVDM---P RP KPSPR VSVG, SVSV	22.7	70.0	100%	121	8/12 (66%) 5/5 (100%) 4/4 (100%)
AAI46865.1	Microtubule-associated protein 9 [Homo sapiens]	KPSPRP	22.3	41.6	58%	162	6/6 (100%)
NP_003728.1	protocadherin-16 precursor [Homo sapiens]	GMK-SPRP	21.8	21.8	66%	217	7/8 (87%)
BAB61903.2	KIAA1773 protein [Homo sapiens]	GMK-SPRP	21.8	21.8	66%	217	7/8 (87%)
NP_055816.2	msx2-interacting protein [Homo sapiens]	VSVSMKP SPRP	21.8	50.3	91%	217	6/7 (85%) 4/4 (100%)
AAH14640.1	COL14A1 protein [Homo sapiens]	VSIGSKPSAR	21.4	21.4	83%	292	7/10 (70%)
CAA72402.1	collagen type XIV [Homo sapiens]	VSIGSKPSAR	21.4	21.4	83%	292	7/10 (70%)
NP_036440.1	lysine-specific demethylase 2A [Homo sapiens]	MKPAPR	21.0	21.0	50%	391	5/6 (83%)

[0272]

AAH28694.1	Tudor domain containing 7 [Homo sapiens]	SVGKKPNPA	20.6	38.2	83%	525	7/10 (70%)
2VKT_A	Chain A, Human Ctp Synthetase 2-Glutaminase Domain In Complex With 5-Oxo-L-Norleucine	MKPSP	20.2	20.2	41%	704	5/5 (100%)
BAF94481.1	T cell receptor alpha variable 38 [Homo sapiens]	MKPGPR	20.2	20.2	50%	704	5/6 (83%)
NP_001124387.1	MEF2-activating motif and SAP domain-containing transcriptional regulator isoform 1 [Homo sapiens]	MKPSP PSPR	20.2	36.1	50%	704	5/5 (100%) 4/4 (100%)
AAH06256.2	CTPS2 protein [Homo sapiens]	MKPSP	20.2	20.2	41%	704	5/5 (100%)
AAF23433.3	breast cancer-associated antigen BRCA1 [Homo sapiens]	SVSTGMK	20.2	20.2	58%	704	6/7 (85%)
2AF0_A	Chain A, Structure Of The Regulator Of G-Protein Signaling Domain Of Rgs2	MKPSP	20.2	20.2	41%	704	5/5 (100%)

[0273] 表 3-10 :十二肽 CCSP4 序列与蛋白质数据库的对比结果

[0274]

Accession	Description	Subject sequence	Max score	Total score	Query coverage	E value	Identities
NP_001398.2	cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 precursor [Homo sapiens]	MDASPRERL	27.8	62.6	100%	3.5	7/9 (77%)
EAW64914.1	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 (flamingo homolog,	MDASPRERL	27.8	46.2	100%	3.5	7/9 (77%)

[0275]

	Drosophila) [Homo sapiens]						
AAU949 38.1	anchor protein [Homo sapiens]	MDASPRERL	2 7. 8	80.2	100%	3.5	7/9 (77%)
AAF6192 9.1	protocadherin Flamingo 1 [Homo sapiens]	MDASPRERL	2 7. 8	62.6	100%	3.5	7/9 (77%)
BAA3246 4.1	MEGF2[Homo sapiens]	MDASPRERL	2 7. 8	46.2	100%	3.5	7/9 (77%)
EAW819 13.1	BTB (POZ) domain containing 6, isoform CRA_a [Homo sapiens]	MDSSPR	2 3. 1	23.1	50%	90	6/6 (100%)
CAI2306 5.1	coagulation factor V (proaccelerin, labile factor) [Homo sapiens]	SMNSSPR	2 3. 1	23.1	58%	90	6/7 (85%)
AAA524 24.1	coagulation factor V precursor [Homo sapiens]	SMNSSPR	2 3. 1	23.1	58%	90	6/7 (85%)
AAF3653 6.1	glucocorticoid receptor AF-1 coactivator-1 [Homo sapiens]	MDSSPR	2 3. 1	23.1	50%	90	6/6 (100%)
ABD2300 3.1	coagulation factor V [Homo sapiens]	SMNSSPR	2 3. 1	23.1	58%	90	6/7 (85%)
NP_0011 71602.1	pro-epidermal growth factor isoform 3 preproprotein [Homo sapiens]	MDGSQRERL	2 2. 3	22.3	75%	162	6/9 (66%)
EAW967 97.1	hCG21937, isoform CRA_b [Homo sapiens]	SPRDRL	2 2. 3	39.0	50%	162	6/6 (100%)
EAW747 64.1	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 1, isoform CRA_b	MVSMLEE---R DRL	2 2. 3	22.3	100%	162	8/14 (57%)

[0276]

	[Homo sapiens]						
BAF9455 8.1	T cell receptor beta variable 21 [Homo sapiens]	SSPRDR	2 1. 8	21.8	50%	217	6/6 (100%)
EAW621 59.1	bromodomain containing 8, isoform CRA_a [Homo sapiens]	VSMDS	2 1. 8	21.8	50%	217	6/6 (100%)
BAA7490 5.2	KIAA0882 protein [Homo sapiens]	DSSPRD	2 1. 8	21.8	50%	217	6/6 (100%)

[0277] 3.3.2.3 氨基酸序列组成及特点分析

[0278] 将 CCSP1、CCSP2、CCSP3、CCSP4 四条十二肽基序用 ExPASy 网站提供的软件 ProtParamtool (<http://cn.expasy.org/tools/protparam.html>) 来分析其氨基酸组成及其特点如下：

[0279] 表 3-11：十二肽的氨基酸组成及特点

[0280]

Peptide Sequence: -SPSIDTRYSRLG-		
Number of amino acids: 12		
Molecular weight: 1351.4		
Theoretical pI: 8.46		
Amino acid composition:		
Arg (R)	2	16.7%
Asp (D)	1	8.3%
Gly (G)	1	8.3%
Ile (I)	1	8.3%
Leu (L)	1	8.3%
Pro (P)	1	8.3%
Ser (S)	3	25.0%
Thr (T)	1	8.3%
Tyr (Y)	1	8.3%
Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 1		
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 2		
Atomic composition:		
Carbon	C	57
Hydrogen	H	94
Nitrogen	N	18
Oxygen	O	20
Formula: C ₅₇ H ₉₄ N ₁₈ O ₂₀		
Total number of atoms: 189		
Estimated half-life:		
The N-terminal of the sequence considered is S (Ser).		
The estimated half-life is: 1.9 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).		
>20 hours (yeast, in vivo).		
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).		
Instability index:		

[0281]

The instability index (II) is computed to be 59.07. This classifies the protein as unstable.		
Aliphatic index: 65.00		
Peptide Sequence: -CVSVGMKPSRP-		
Number of amino acids: 12		
Molecular weight: 1257.5		
Theoretical pI: 9.51		
Amino acid composition:		
Arg (R)	1	8.3%
Cys (C)	1	8.3%
Gly (G)	1	8.3%
Lys (K)	1	8.3%
Met (M)	1	8.3%
Pro (P)	3	25.0%
Ser (S)	2	16.7%
Val (V)	2	16.7%
Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 0		
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 2		
Atomic composition:		
Carbon	C	53
Hydrogen	H	92
Nitrogen	N	16
Oxygen	O	15
Sulfur	S	2
Formula: C ₅₃ H ₉₂ N ₁₆ O ₁₅ S ₂		
Total number of atoms: 178		
Estimated half-life:		
The N-terminal of the sequence considered is C (Cys).		
The estimated half-life is: 1.2 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).		
>20 hours (yeast, in vivo).		
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).		
Instability index:		
The instability index (II) is computed to be 51.96. This classifies the protein as unstable.		
Aliphatic index: 48.33		
Peptide Sequence: -SVSVGMKPSRP-		
Number of amino acids: 12		
Molecular weight: 1241.4		
Theoretical pI: 11.00		
Amino acid composition:		
Arg (R)	1	8.3%
Gly (G)	1	8.3%
Lys (K)	1	8.3%
Met (M)	1	8.3%
Pro (P)	3	25.0%
Ser (S)	3	25.0%

[0282]

>20 hours (yeast, in vivo). >10 hours (Escherichia coli, in vivo).
Instability index: The instability index (II) is computed to be 65.32. This classifies the protein as unstable.
Aliphatic index: 56.67

[0284] 3.3.2.4 短肽的疏水性分析

[0285] 噬菌体展示的十二肽可以保持相对的空间结构,通过模拟配基蛋白中的氨基酸决定簇与细胞表面受体结合,这往往需要满足一定的条件,如具有亲水基团、位于蛋白质的表面及一定的柔韧性等。由于蛋白质的 N 端和 C 端序列的氨基酸通常位于蛋白质表面,一般都带有亲水基团,如 NH₃⁺ 和 COO⁻,通常具有一定的柔韧性,所以 N 端和 C 端通常被视为寻找氨基酸决定簇的理想位置,而噬菌体随机展示多肽也大多构建在衣壳蛋白的 N 端。疏水性氨基酸在蛋白质内部,由于其疏水的相互作用,在保持蛋白质的三级结构上起重要作用,在酶和基质、抗体和抗原间的相互作用等各种非共价键的分子结合方面也具有重要作用,例如在抗体的与抗原结合的部位上有很多疏水性氨基酸,它参与半抗原的结合。在维持生物膜的结构方面,疏水性氨基酸也具有作用,形成一个疏水的区域亲水指数在蛋白质结构的研究中十分重要,具有疏水性的氨基酸在蛋白质的三维结构中趋向于朝向内部,而具有亲水性的氨基酸常朝向蛋白质表面的状态,氨基酸疏水基团的作用力可以使小分子多肽能够与蛋白质发生特异性结合,而疏水基团集中的区域往往是具有较高同源性的部位。疏水性氨基酸有酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和丙氨酸。疏水性最强的两种氨基酸分别是异亮氨酸(亲水指数为 4.5)与缬氨酸(亲水指数为 4.2);亲水性最强的两种氨基酸分别是精氨酸(亲水指数为 -4.5)和赖氨酸(亲水指数为 -3.9)。利用 ExPASy 网站 ProtParam tool 工具分析四条多肽序列的疏水性,利用 BioEdit 软件中的 Kyte & Doolittle Mean Hydrophobicity Profile 工具分析多肽每个氨基酸的疏水性。氨基酸的疏水指数介于 -4.5 ~ 4.5 之间,数字越大表示疏水程度越高,数字越小表示亲水能力越强,中间表示中性。四条多肽的亲水性分析表明(图 5),它们均为亲水性多肽,且 CCSP1 的亲水性最强,CCSP2 的亲水性最弱。

[0286] 表 3-12:多肽基序的平均疏水性

[0287]

Peptide Name	Peptide Sequence	GRAVY Index
CCSP1	SPS <u>I</u> DTRY SRLG	-0.883
CCSP2	<u>C</u> V <u>S</u> V <u>G</u> M <u>K</u> PSPRP	-0.200
CCSP3	<u>S</u> V <u>S</u> V <u>G</u> M <u>K</u> PSPRP	-0.457
CCSP4	<u>M</u> V <u>S</u> M <u>D</u> SSPRDRL	-0.683
Motif sequence with hydrophobicity and hydrophilicity	□□●○□●●●●●□	

[0288] 注:图中的 CCSP1 中的 I(左起第 4 位点),CCSP2 中的 C、V、V、M(左起第 1、2、4、6 位点),CCSP3 中的 V、V、M(左起第 2、4、6 位点),CCSP4 中的 M、V、M、L(左起第 1、2、4、12 位点)为疏水位点,其余为亲水位点。□表示疏水或亲水性不定位点,●表示亲水性位点,○表示疏水性位点。

[0289] 3.4 细胞免疫荧光法鉴定阳性噬菌体克隆的靶向性

[0290] 采用细胞免疫荧光技术,以 FITC 标记的 IgG 为二抗,抗 M13 多克隆抗体为一抗,荧光显微镜放下显示绿色荧光。将展示四条 Caco-2 细胞特异性多肽基序的噬菌体阳性克隆、无关克隆对照 (URPs) 和 PBS 对照分别与结肠癌 Caco-2 细胞和人胚肾 HEK293 细胞孵育,经过洗涤和一抗二抗孵育,倒置荧光显微镜下检查结果如图 6 所示,结果显示展示 CCSP1 ~ 4 多肽的噬菌体阳性克隆均不同程度地结合到 Caco-2 细胞上,细胞表面和细胞膜边缘呈现绿色荧光,其中展示 CCSP2 和 CCSP3 的 Q24 和 Q29 噬菌体克隆荧光较 Q16 和 Q28 克隆强一些,人胚肾 HEK293 细胞无绿色荧光,提示阳性噬菌体克隆不与 HEK293 细胞结合, PBS 对照组和无关克隆对照组亦无绿色荧光。

[0291] 四、讨论

[0292] 4.1 噬菌体多肽展示技术在肿瘤全细胞筛选中的意义

[0293] 本发明中肿瘤细胞的培养为肿瘤细胞特异性多肽的筛选奠定良好基础,结直肠癌 Caco-2 细胞系源自于人结肠腺癌细胞,容易在体外培养,稳定性好,贴壁性较强,容易形成致密单细胞层,形态上与人肠上皮细胞极为相似,具有维持细胞极性的重要结构,如微绒毛和紧密连接,因其是与肠上皮细胞结构和功能上相似的癌细胞,所以被广泛用作消化道疾病研究的细胞模型。

[0294] 噬菌体多肽展示技术以其强大的淘选能力,广泛地应用于各种靶分子(抗体、酶、细胞表面受体等)特异性配体的筛选。该技术创立之初,一般的生物淘选方法是将噬菌体多肽库与包被于 96 孔酶标板中或小磁珠上的靶分子或蛋白相孵育,用含 0.01% ~ 0.2% Tween-20 的 PBS 或 TBS 等洗涤剂洗去未结合及亲和力较弱的噬菌体,而后用 Glycine-HCl 酸性洗脱液洗脱特异性结合的噬菌体,回收的噬菌体然后再经感染细菌扩增,重复结合和洗脱过程,使那些能展示最紧密结合肽序列的噬菌体得到逐步的富集。这样经过 3 轮筛选/扩增循环后, DNA 测序鉴定所得克隆的特征。与 cDNA 文库的筛选相比,噬菌体展示技术的主要优点是容易对库容量较大的文库进行筛选,不受噬菌斑数目或能通过杂交筛选的克隆数目的限制,亲和筛选过程在液相环境中进行,相对于人工合成多肽序列进行的筛选,库容量通常能达到 10¹³ 个数量级,多样性大于 10⁹,筛选程序操作简单,节省了大量的人力物力,筛选结束后测序模板纯化步骤简单,测序模板只需要 5 μl,在亲和筛选步骤中可以人工控制筛选强度,从而特异性多肽的富集程度逐轮递增,可以达到 ~ 10¹⁰,可筛选获得许多具有各种不同程度亲和力的多肽序列。由于被筛选的噬菌体库还可以在大肠杆菌中进行再扩增,从而便可以连续多轮的迭代选择,文库使用的 M13 噬菌体为非裂解性噬菌体(溶源性),无需体外包装,电转化效率高。噬菌斑的形成不是由于菌体裂解而是由于细胞生长力减弱所致,用有 α-互补的宿主菌在含 IPTG/Xgal 的平板上可呈蓝斑。由于 M13 噬菌体在增殖期间不裂解宿主菌,噬菌体纯化步骤简单,用简单的 PEG/NaCl 沉淀方法就足以将噬菌体与其他所有污染的细胞蛋白分开,避免了细胞蛋白的污染。

[0295] 有大量研究报道噬菌体多肽展示可以利用完整细胞筛选到细胞表面受体的新配体,某一特定类型的肿瘤细胞可能会有成百上千种不同的受体,理论上每种受体都可能从文库中找到一个配体。因此,将体外培养的肿瘤细胞或者来源于病人的肿瘤组织作为筛选特异性配体的靶分子逐渐成为肿瘤靶向治疗和诊断的新热点,以活细胞为靶筛选具有更加重要的生物学意义:首先,噬菌体展示技术创立之初是以某些已知的人工纯化的蛋白或者

人工合成的小分子为靶分子进行筛选,虽然筛选的多肽也具有高的亲和力和特异性,但是肿瘤细胞表面受体类型复杂,人工纯化和合成操作繁琐、价格昂贵,且纯化的分子种类有限,大大限制了肿瘤特异性配体的筛选以及表位研究,而完整活细胞的筛选程序较为简单,体外细胞培养技术成熟,筛选过程没有偏向性,亲和吸附完全取决于细胞表面分子的表达和活性,使噬菌体展示多肽与一些未知的或者难以纯化的蛋白分子发生特异性结合成为可能,可以筛选获得更多的肿瘤细胞特异性结合多肽,为肿瘤细胞表面受体识别表位的研究奠定良好基础。其次,活细胞与经固定剂处理的细胞相比,细胞表面各种受体和蛋白可以较好地保持空间结构特征和生物活性,使得肿瘤细胞特异性结合的多肽基序与天然的受体识别位点更加一致。再次,对于完整活细胞的筛选,事先无需深入了解细胞表面的复杂程度和细胞表面受体三维结构特征,亦不需要选定某种靶分子,而且噬菌体多肽空间结构较小,有研究表明可以通过受体介导的内吞作用进入细胞质,与细胞内某些受体结合,因此适合于对于肿瘤细胞这样细胞表面形貌高度复杂和变异性强的细胞。

[0296] 4.2 利用噬菌体肽库进行全细胞筛选的策略

[0297] 研究表明噬菌体多肽与肿瘤细胞特异性识别有两种方式:(1)噬菌体多肽通过与细胞表面受体或糖蛋白结合停留在细胞表面;(2)噬菌体多肽与某些细胞受体结合,通过受体介导的内吞作用进入细胞质内,识别胞质内信号网络。国内外已有筛选肿瘤细胞表面结合多肽和肿瘤细胞内化肽的相关报道,Cao Jie 等以表达 hCD81 的鼠 NIH/3T3 细胞为靶细胞,从噬菌体展示九肽库中筛选 hCD81 结合肽,将 4×10^{10} TU 噬菌体与 BSA 封闭的 NIH/3T3 野生型细胞孵育,离心取上清后再与 35mm 培养皿中 NIH/3T3-hCD81 细胞孵育,0.1% TBST 洗涤未结合噬菌体,Glycine-HCl 洗脱特异性结合的噬菌体后 Tris-HCl 中和,感染 XL1-blue 大肠杆菌扩增后进行下轮筛选,获得特异性结合表达 hCD81 的 NIH/3T3 细胞的多肽基序 SPQYWTGPA。Albert 等 [96] 采用全细胞筛选的方法,获得肝癌细胞特异性多肽 SP94,是将体外培养的 Mahlavu 细胞待 70 ~ 80% 汇合后,消化收集细胞于离心管中,用含 1% BSA 的无血清培养基封闭,加入 1.5×10^{11} pfu 噬菌体后将细胞悬液于 4℃ 孵育,转移悬液至有机溶剂(邻苯二甲酸酯与环乙烷 9 : 1 混合)上层,离心去上清,结合有噬菌体的细胞沉淀用含宿主菌的 LB 培养基重悬扩增。张阳德等 [115] 采用全细胞消减筛选结肠癌细胞特异性噬菌体多肽,以体外培养结肠癌 SW480 细胞为靶细胞,以人肠上皮细胞为阴性吸附细胞,细胞汇合后无血清培养基孵育 1h 后洗涤细胞,含 5% BSA 的噬菌体肽库 (10^{11} pfu) 与人肠上皮细胞孵育,收集未结合的噬菌体上清,与 SW480 细胞孵育,洗涤未结合的噬菌体,消化收集细胞沉淀后感染细菌扩增滴定。张炳华等以肝癌 HepG2 细胞为靶细胞,以 L-02 细胞系为阴性吸附细胞进行消减筛选,将 90% 以上汇合的细胞无血清培养 1h,5% BSA 封闭,噬菌体七肽库 (2×10^{11} pfu) 与 L-02 细胞孵育,消化收集细胞,离心取上清,与封闭的 HepG2 细胞孵育 1h,消化收集细胞沉淀,0.1% TBST 洗涤细胞、离心收集细胞,反复 10 次,感染宿主菌扩增滴定后进行 4 轮消减筛选,获得肝癌特异性噬菌体多肽 HCBP1 (FQHPSFI)。

[0298] 本发明在结直肠癌 Caco-2 细胞表面进行筛选,为获得高特异性的噬菌体结合肽,采用体外培养的细胞系进行 4 轮消减筛选,以人胚肾 HEK293 细胞为阴性吸附细胞,吸附除去非特异的噬菌体,获得只与靶细胞结合的噬菌体克隆,经过 4 轮筛选后随机挑取 30 个克隆经 ELISA 鉴定阳性克隆,有 10 个克隆与结肠癌 Caco-2 细胞特异性结合。

[0299] 4.3 噬菌体阳性克隆的分析与鉴定

[0300] 4.3.1 酶联免疫试验 (ELISA) 鉴定阳性噬菌体克隆

[0301] 经过全细胞 ELISA 鉴定阳性克隆发现有 10 个克隆与结肠癌 Caco-2 细胞亲和力较高, 扩增纯化 ssDNA 进行全自动测序, 获得四条噬菌体多肽, 这四个克隆的序列分别为 SPSIDTRYSLG、CVSVGMKPSRP、SVSVGMKPSRP、MVSMDSSPRDRL, 而噬菌体原库无关克隆对照序列为 EHDTTGTAYS RD。ELISA 进一步鉴定阳性克隆对于 Caco-2 细胞亲和力发现, 10 个克隆在 OD450nm 值显著高于无关克隆对照及 PBS 对照组 ($P < 0.01$), 无关克隆对照和 PBS 对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$), 10 个阳性克隆中 Q23 号克隆 (展示 CCSP1 多肽) 和 Q29 号克隆 (展示 CCSP3 多肽) 亲和力显著高于其他阳性克隆克隆组 ($P < 0.05$)。

[0302] 4.3.2 多肽基序的同源性分析

[0303] 通过 FASTA 和 BioEdit 软件比较四种多肽片段之间的同源性, 寻找 Motif Sequence, 四条多肽序列具有相似性, 含有保守基序, 其中 CCSP2 和 CCSP3 与 CCSP4 同源性为 21%, 而 CCSP2 和 CCSP3 同源性高达 57%, BioEdit 分析保守位点为第 3 位丝氨酸位点和第 10 位精氨酸位点, 比对发现 Motif sequence 为 XXSXXXXXXXXRXX。

[0304] 经过 BLAST 检索四条多肽基序与数据库中蛋白的同源性结果显示, 四条多肽与某些细胞表面受体均有一定的相似性, 如 CCSP1 与免疫球蛋白超家族成员 8 等蛋白同源性较高, CCSP2 与 Death-inducer obliterator 1 和微管相关蛋白 9 等蛋白具有较高同源性, CCSP3 多肽与 Death inducer-obliterator-3、乳腺癌相关抗原 BRCAA1 和 G 蛋白信号结构域调节结构同源性较高。

[0305] 4.3.3 氨基酸序列组成及特征分析

[0306] 利用 ProtParam tool 等工具对四条多肽的基本特征和氨基酸组成分析表明, 它们均富含丝氨酸、脯氨酸、精氨酸、缬氨酸和天冬氨酸, 其中 CCSP1 含精氨酸 (16.7%) 和丝氨酸 (25%) 较多, CCSP2 含脯氨酸 (25%)、丝氨酸 (16.7%) 和缬氨酸 (16.7%) 比例较高, CCSP3 含脯氨酸 (25%)、丝氨酸 (25%) 和缬氨酸 (16.7%), CCSP4 富含丝氨酸 (25%)。对四条多肽的亲水和疏水性分析表明它们均为亲水性多肽, 其中 CCSP1 亲水性最强 (-0.883), CCSP2 亲水性最弱 (-0.200)。

[0307] 4.3.4 阳性克隆的靶向性鉴定

[0308] 细胞免疫荧光方法进一步鉴定阳性克隆的靶向性, 可以直观地检测噬菌体克隆结合到细胞表面, 展示 CCSP1 ~ 4 多肽的噬菌体克隆分别与结肠癌 Caco-2 细胞和人胚肾 HEK293 细胞孵育, 山羊抗 M13 抗体作为一抗, FITC 标记的兔抗山羊 IgG 作为二抗, 倒置荧光显微镜观察, 噬菌体阳性克隆均可以与 Caco-2 细胞结合, 可见细胞表面绿色荧光, 且表达 CCSP2 与 CCSP3 多肽的噬菌体克隆荧光强度较高, 而不结合 HEK293 细胞, 无关克隆对照与 PBS 对照组均无绿色荧光, 进一步表明四条噬菌体展示多肽可特异性识别结肠癌 Caco-2 细胞。

[0309] 4.4 本发明的特点

[0310] 4.4.1 全细胞消减筛选的方法

[0311] 采用全细胞消减筛选的方法可以有效地提高细胞筛选的特异性, 排除系统和人为因素造成的非特异性结合, 在全细胞筛选的过程中, 体外培养的结肠癌 Caco-2 细胞贴壁性较强, 容易形成单细胞层, 具有紧密连接, 光学显微镜下就有“铺路石”样形态特征, 因此无需固定或制备细胞悬液, 使得癌细胞维持了较好的生理状态和细胞表面受体空间构象, 采

用人胚肾 HEK293 细胞系吸附与正常细胞结合的噬菌体,直接将噬菌体加入细胞培养瓶中孵育,使得筛选效率可能更高。

[0312] 4.4.2 筛选条件的优化

[0313] 在噬菌体多肽库筛选的过程中影响筛选效率的因素较多,如噬菌体的滴度、靶细胞的数量、封闭、洗涤液中吐温的浓度、洗涤次数和时间、孵育温度和孵育体积等,要保证筛选到特异性多肽,筛选过程控制筛选的严谨度,筛选的严谨度也叫筛选强度,是指筛选条件的严密程度,包括培养靶细胞的面积和数量、噬菌体稀释液体积、洗涤的次数和时间等,洗涤液中吐温含量越高,洗涤时间越长,洗涤次数越多,严谨度就越高,尽管筛选的强度越高,噬菌体阳性克隆的比例越高,但是在首轮筛选中不能将筛选强度设定很高,因为随着筛选强度的增大,回收到的噬菌体多态性(种类)将大大降低,可能导致第4轮筛选完回收的噬菌体只表达某一种多肽,甚至出现偏好性,本发明采用逐轮增加筛选强度的方法,均衡回收率和筛选强度,逐步增加与阴性细胞的吸附时间、缩短与靶细胞的孵育时间、增加对于回收细胞沉淀的洗涤次数,以使亲和力较强的噬菌体克隆逐步富集。

[0314] 4.4.3 操作过程中需要注意的环节

[0315] (1) 理论上,体外培养的细胞数量越多,就会有更多的噬菌体会结合到靶细胞上,但是在实际操作过程中,细胞数目达到 10^6 就已足够,加入噬菌体稀释液的体积尽量要小,分子浓度高的情况下更有利于特异性多肽的筛选,培养瓶体积太大时就需要将噬菌体稀释,单位面积上的噬菌体分子极少,容易发生非特异吸附。

[0316] (2) 细胞必须在生长状态极佳的情况下筛选此时细胞贴壁牢固,洗脱时不易脱落,且细胞伪足充分伸展,细胞表面受体分子空间构想充分暴露,更有利于噬菌体多肽的识别。本研究中 Caco-2 细胞贴壁性强,即使在振荡洗涤时也不易脱落,细胞长满单层时形成紧密连接,完全覆盖培养瓶底部,使得封闭完全,但是 HEK293 细胞贴壁性较差,而且细胞间间隙较大,细胞少于 80% 汇合时极易脱落,洗涤时洗涤液必须沿培养瓶侧壁缓慢加入,动作要轻微,切忌将洗涤液直接对准细胞加入,防止细胞大片脱落而暴露出培养瓶底。

[0317] (3) 封闭剂通常会选择 5% 脱脂奶粉或 3%~5% 牛血清白蛋白 (BSA),前者封闭效果较好,但在预实验过程中发现脱脂奶粉颗粒较大,封闭后洗涤时容易引起细胞大片脱落,因此本研究采用 BSA 作为封闭剂。

[0318] (4) 经典的筛选方法是将细胞接种至 96 孔板中,洗脱特异性噬菌体克隆时使用 Gly-HCl 洗脱,然后中和,参照张阳德等 [115] 的新筛选方法,噬菌体与靶细胞孵育后不经酸性洗脱,而是消化收集细胞,将细胞反复洗涤,除去非特异结合的噬菌体,将结合有噬菌体的细胞直接感染宿主菌,这是一种新的全细胞筛选方法。

[0319] (5) 洗涤剂可以选用含 Tween-20 的 PBS 或 TBS 缓冲液,加入 Tween-20 可以有效地减少噬菌体与肿瘤细胞或封闭试剂之间的非特异性吸附, Tween-20 的浓度逐轮递增,从第一轮开始分别为 0.1%, 0.2%, 0.3% 和 0.5%。洗涤时不断地轻微转动细胞培养瓶,使每一个角落都要被洗涤。

[0320] (6) 防止野生型噬菌体的污染,操作过程要严格无菌操作,细胞不能有细菌污染,且扩增需要的宿主菌必须是单克隆,噬菌体在扩增过程中不能被污染,一旦有野生型噬菌体污染, M13 噬菌体感染力下降,在扩增后会被野生型噬菌体逐步取代。

[0321] (7) ELISA 加样要使用 8 道移液器,手工操作中如果用单道移液枪会造成加样后等

待时间过长,每个孔孵育时间有差异,加入细胞时要先计数,保证每个孔加入的细胞数量均衡,加入抗体和 TMB 时必须将试剂垂直加入 96 孔板孔中,沿侧壁加入会引起假阳性。

[0322] (8)ELISA 洗板是决定 ELISA 成败的最关键步骤,本研究采用手工洗板法,须避免孔与孔之间交叉,每次洗涤时要尽量将孔注满,洗液量不足会导致洗板不彻底,洗完板之后要将 96 孔板倒置于吸水纸上轻轻拍干,避免液体残留,尤其是抗体,以免造成假阳性。

[0323] (9)ELISA 显色试剂要现用现配,显色必须在避光条件下进行,显色剂避免接触金属器械,肉眼判断显色深浅然后加终止液,加终止液避免产生气泡,终止反应后混匀立即酶标仪检测。

[0324] 4.4.4 完成中出现的问题及解决办法

[0325] (1) 滴定噬菌体平板上无蓝斑 :M13 噬菌体是一个非裂解性噬菌体,不产生清晰的噬菌斑。M13 噬菌斑是一块细胞生长力降低的区域,而不是细胞裂解,所以可能会比较难以观察到。由于用来制备文库的载体含有 lacZ α 基因,当用 α 互补的菌株 (ER2738 菌株) 在含 IPTG/Xgal 的培养基上铺板时,噬菌斑将呈现蓝色,有助于观察。如果未出现蓝斑有以下几个原因 :ER2738 细菌反复冻融造成活力下降 ;宿主菌并非单克隆摇菌 ;制备 LB/IPTG/Xgal 时,如果灭菌的 LB 培养基温度高于 65 $^{\circ}$ C 时加入 IPTG/Xgal 会造成底物不显色 ;滴定时要保证高的感染复数,即 ER2738 细菌数要过量,OD600 ~ 0.5 ;滴定时所用顶层胶中最好用琼脂糖,而不是琼脂粉,因为后者更容易凝固,琼脂在 45 $^{\circ}$ C 水浴中可能会凝固,或者在倒平板时迅速凝固,凝集成颗粒,倒板不均匀,致使无噬菌体斑出现 ;M13 噬菌体是一个雄性特异性大肠杆菌噬菌体,只感染含有性菌毛的噬菌体,因此 LB 液体培养基和平板中要含有 50 μ g/ml 四环素,如果未添加抗生素或者四环素失效,ER2738 摇菌会丢失 F' 因子。

[0326] (2)ELISA 鉴定噬菌体阳性克隆, PBS 空白对照和噬菌体原库克隆对照数值高,与噬菌体单克隆组无差异,涉及因素较多 (封闭液浓度、孵育时间、洗涤强度、显色时间、抗体稀释度等), 需要从以下几个方面优化 :①封闭 :增加封闭液中 BSA 的含量,由 3% 增至 5%, 封闭时间由 37 $^{\circ}$ C, 1h, 增至 2h, 甚至 4 $^{\circ}$ C 过夜 ;②洗涤强度 :洗涤是关键,洗涤强度太小可能导致假阳性,因此将洗涤次数由 3 次增加至 5 次,洗涤时间每次 5min, Tween-20 浓度增加至 0.5% ;③显色时间 :显色结果要肉眼判断,可以在室温孵育或者 37 $^{\circ}$ C 孵育,一般 TMB 显色时间为 10 ~ 30min 之间,如果显色时间过长会导致所有孔中深蓝色 ;④抗体稀释度 :出现背景,需要降低二抗的稀释度,预实验结果显示二抗由 1 : 2000 降至 1 : 8000,同时抗体稀释液要用含有 BSA 的 TBST。

[0327] 4.4.5 本发明获得的研究成果及其意义

[0328] 本发明以结肠癌 Caco-2 细胞为靶细胞,以人胚肾 HEK293 为吸附细胞,采用全细胞筛选策略,经过 4 轮消减筛选,经过酶联免疫吸附试验鉴定,随机挑取的 30 个噬菌体克隆中有 10 个阳性克隆,进一步鉴定 10 个阳性克隆与 Caco-2 细胞的亲和力发现 Q29 号克隆亲和力最高,阳性克隆的测序获得 4 条多肽序列,分别为 SPSIDTRYSLD(CCSP1), CVCSGMKPSRP(CCSP2), SVSVGKPSRP(CCSP3) 和 MVSMDSSPRDL(CCSP4), 分析发现 Motifsequence 为 XXSXXXXXXXXXX, 同源性分析表明 CCSP2 与 CCSP3 同源高达 57%。BLAST 检索蛋白数据库发现 4 条多肽基序与某些细胞表面受体具有同源性,氨基酸疏水性分析显示 4 条多肽均为亲水性氨基酸,其中 CCSP1 亲水指数最高 (-0.883)。四条多肽的氨基酸组成分析结果提示它们富含丝氨酸、脯氨酸、精氨酸、缬氨酸和天冬氨酸,这些氨基酸位点对

于多肽与肿瘤细胞的结合以及多肽空间结构的维持起到重要作用。细胞免疫荧光进一步鉴定展示四条多肽的噬菌体克隆对于结肠癌 Caco-2 细胞的靶向性,噬菌体阳性克隆均可以特异性靶向 Caco-2 细胞,而不识别 HEK293 细胞,其中含有 CCSP2 与 CCSP3 多肽的噬菌体克隆靶向性 较强,提示本课题筛选的噬菌体多肽基序能特异性结合结肠癌 Caco-2 细胞。

[0329] 本发明利用噬菌体多肽展示技术,筛选获得 4 条结肠癌 Caco-2 细胞特异性多肽,在结直肠癌早期检测和靶向治疗方面具有潜在的应用价值,在治疗方面,有望利用这些特异性高、分子量小、穿透力强、亲和力高的短肽来取代传统化疗药物,或与某些化疗药物如顺铂、阿霉素等偶联,达到靶向给药的目的,减小化疗药物的非特异性和毒副作用;在结肠癌早期检测方面,利用荧光标记的多肽可以结合结肠癌细胞而非正常组织,结肠癌细胞特异性多肽经放射性同位素标记能够在肿瘤组织中特异性富集,适用于肿瘤成像和分子影像诊断,多肽对于肿瘤细胞分子标记物设计和造影剂的改造也具有重要意义,对于结肠癌早期检测、癌细胞定位和疗效评价都具有重要意义。

Caco-2 细胞表面特异性结合的 4 条多肽片段的氨基酸序列

<210>1

<211>12

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>1

SPSIDTRYSLG

<210>2

<211>12

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>2

CVSVGMKPSRP

<210>3

<211>12

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>3

SVSVGMKPSRP

<210>4

<211>12

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>4

MVSMDSRPDRL

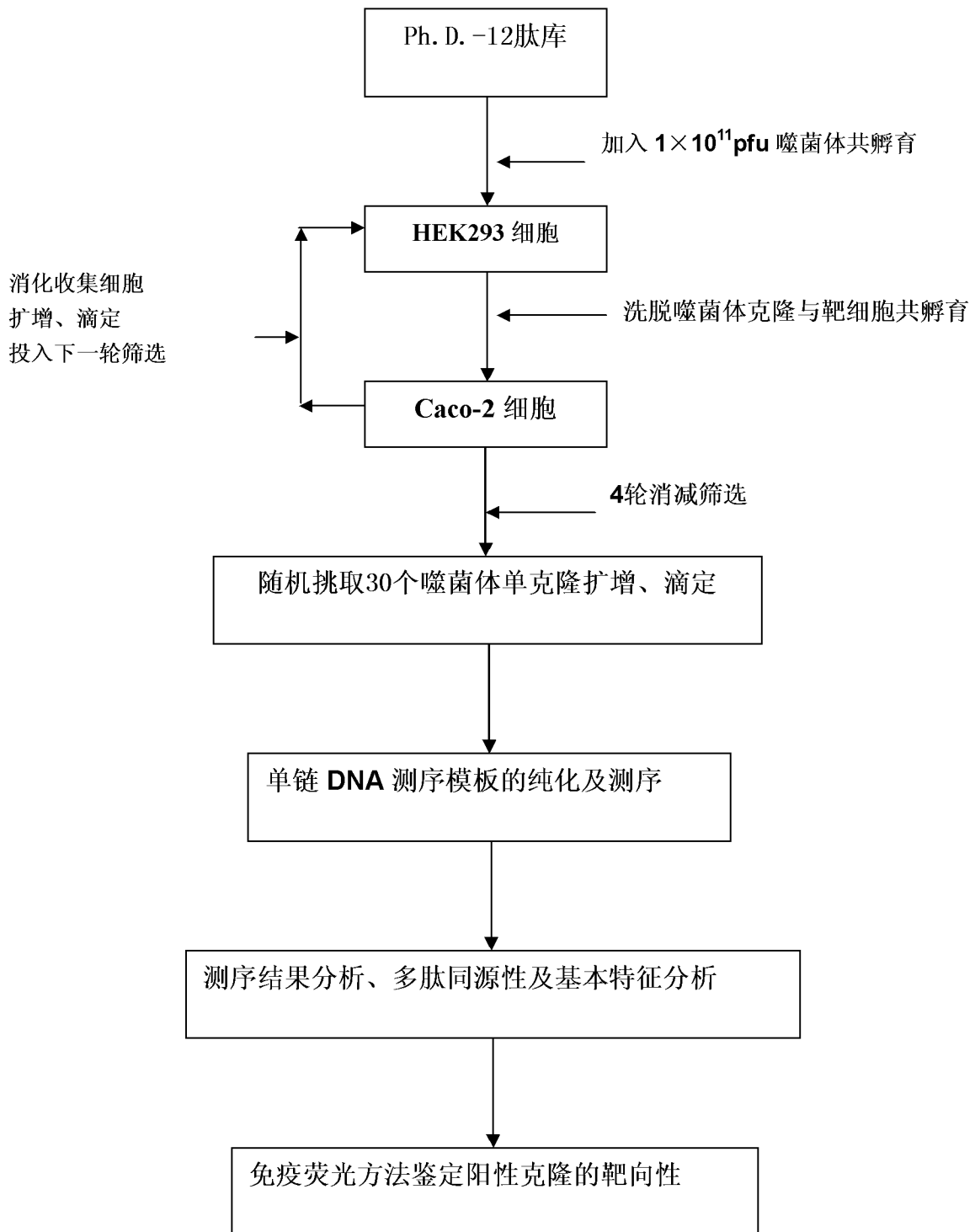
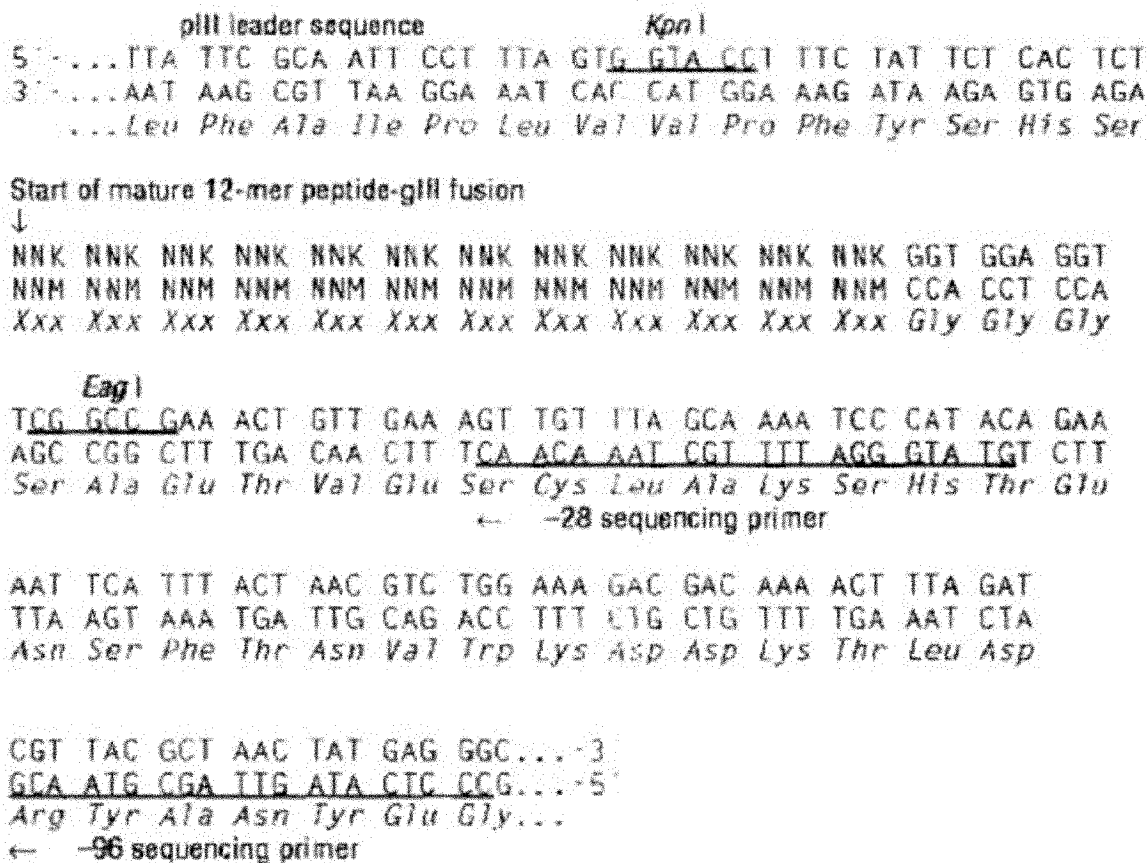


图 1



K = G or T; M = A or C

图 2

		Second Position				
		T	C	A	G	
First Position	T	Phe (F) Leu (L)	Ser (S) Ser (S)	Tyr (Y) Gln* (Q)	Cys (C) Trp (W)	T G
	C	Leu (L) Leu (L)	Pro (P) Pro (P)	His (H) Gln (Q)	Arg (R) Arg (R)	T G
First Position	A	Ile (I) Met (M)	Thr (T) Thr (T)	Asn (N) Lys (K)	Ser (S) Arg (R)	T G
	G	Val (V) Val (V)	Ala (A) Ala (A)	Asp (D) Glu (E)	Gly (G) Gly (G)	T G

图 3

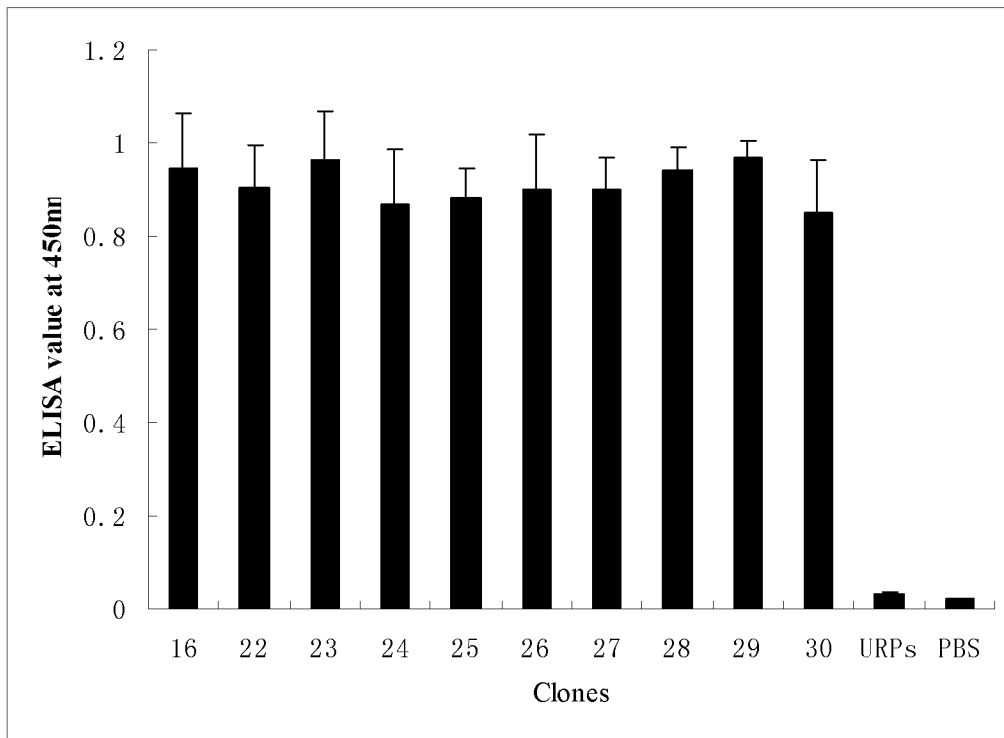


图 4

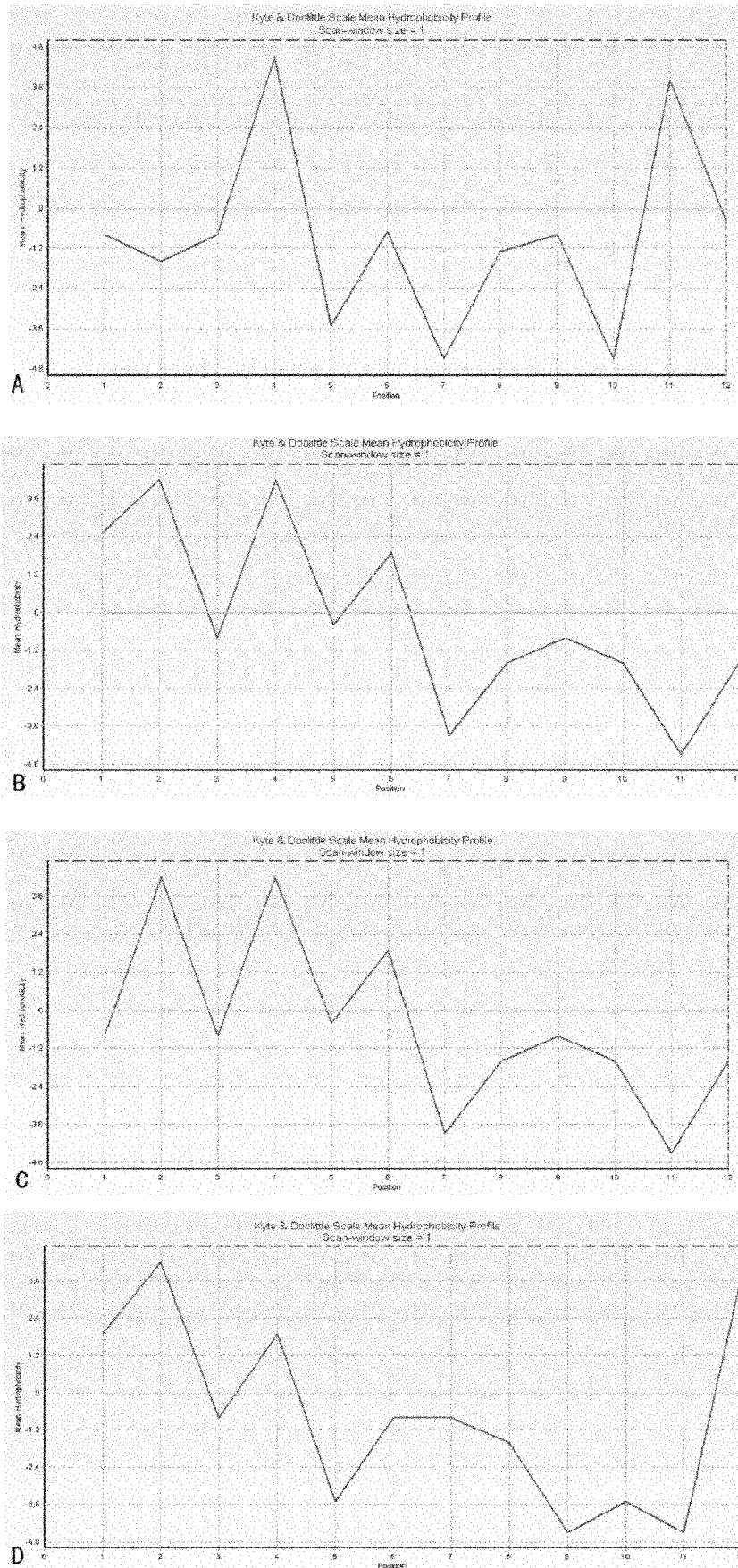
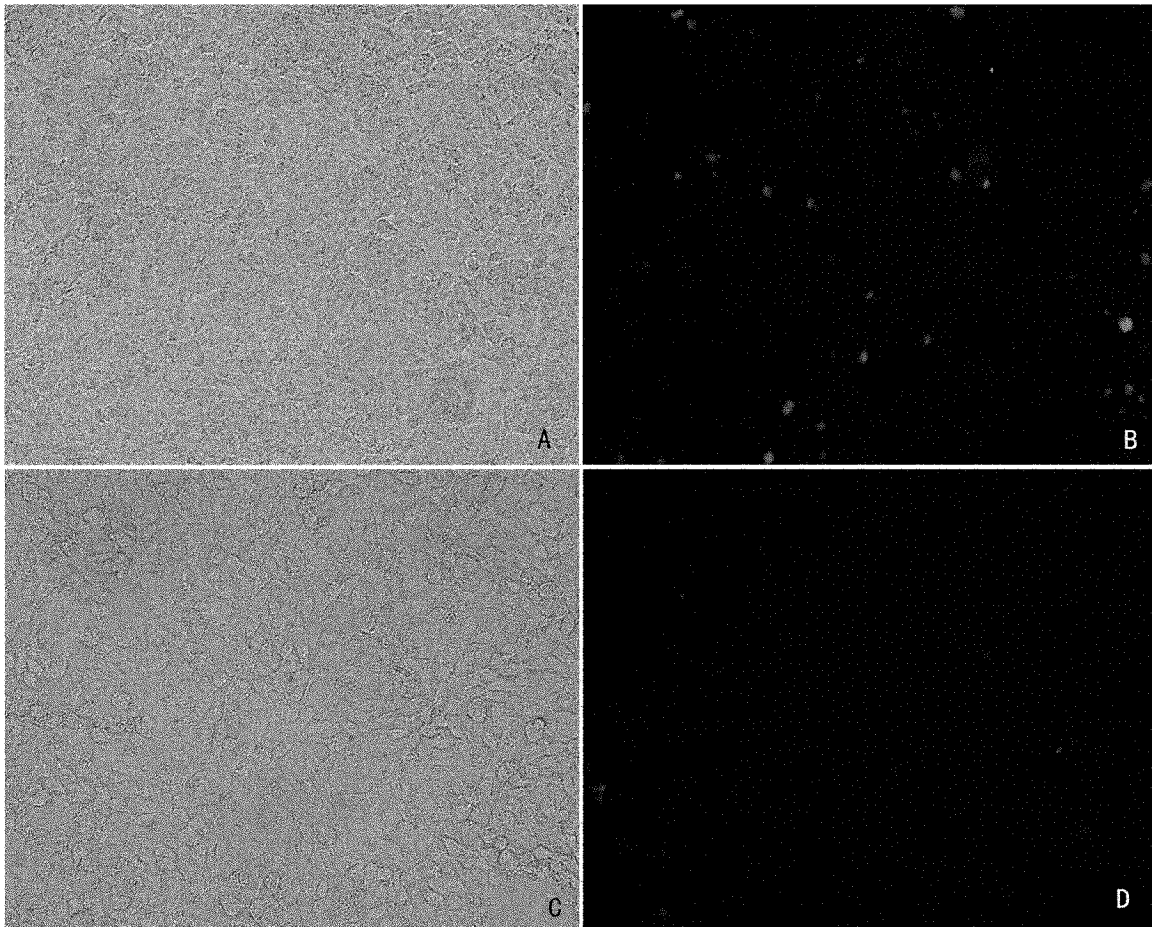
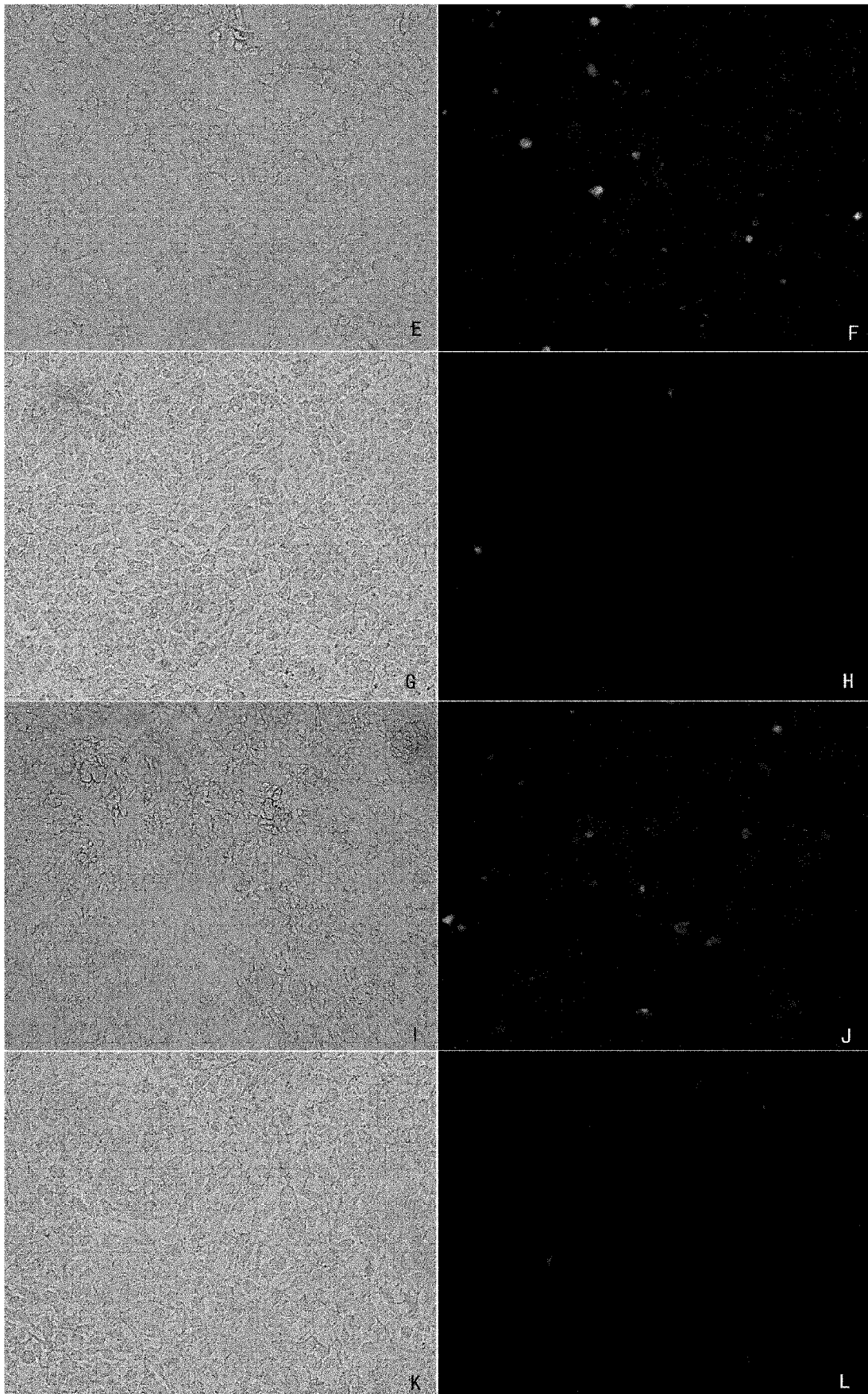
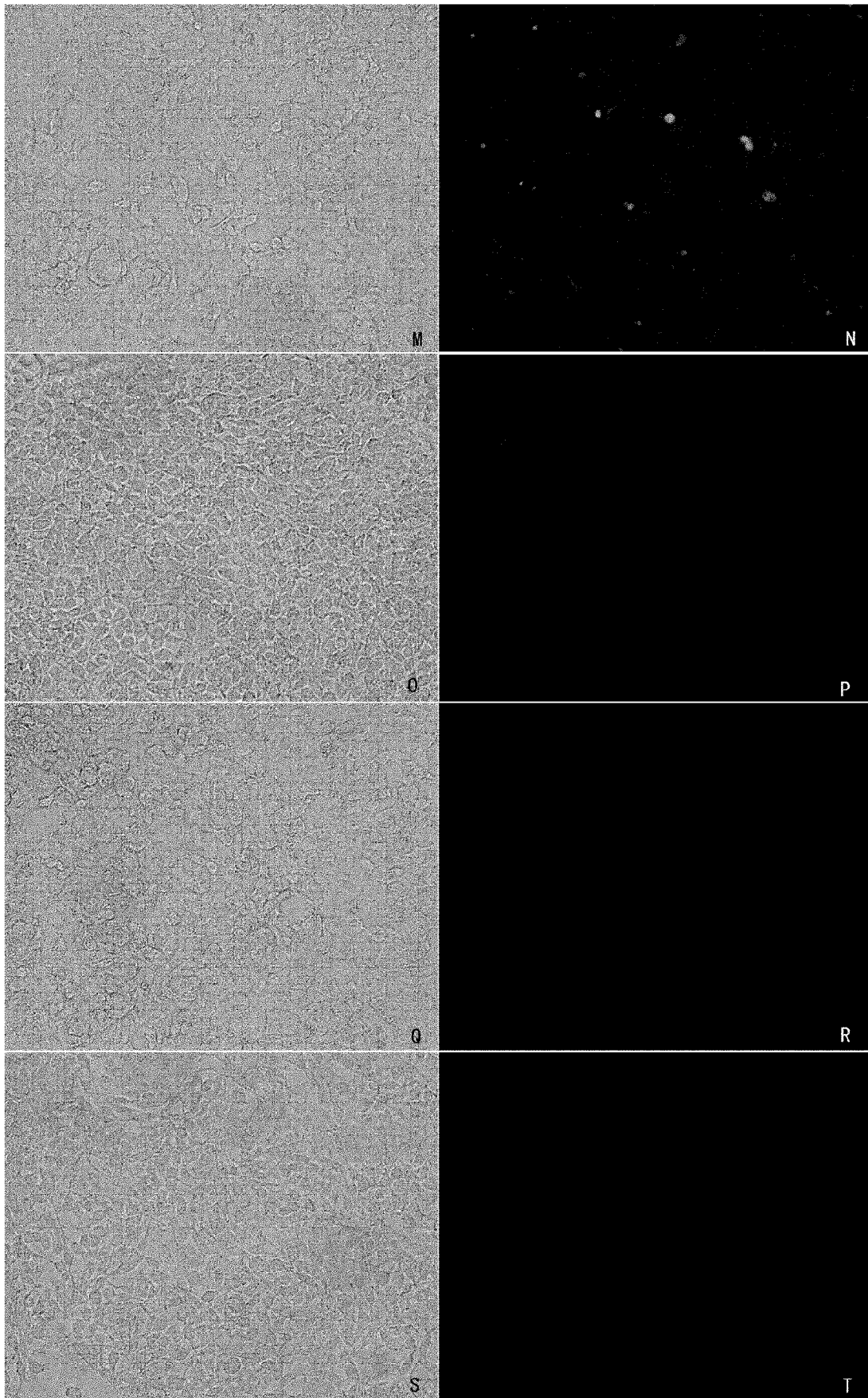


图 5







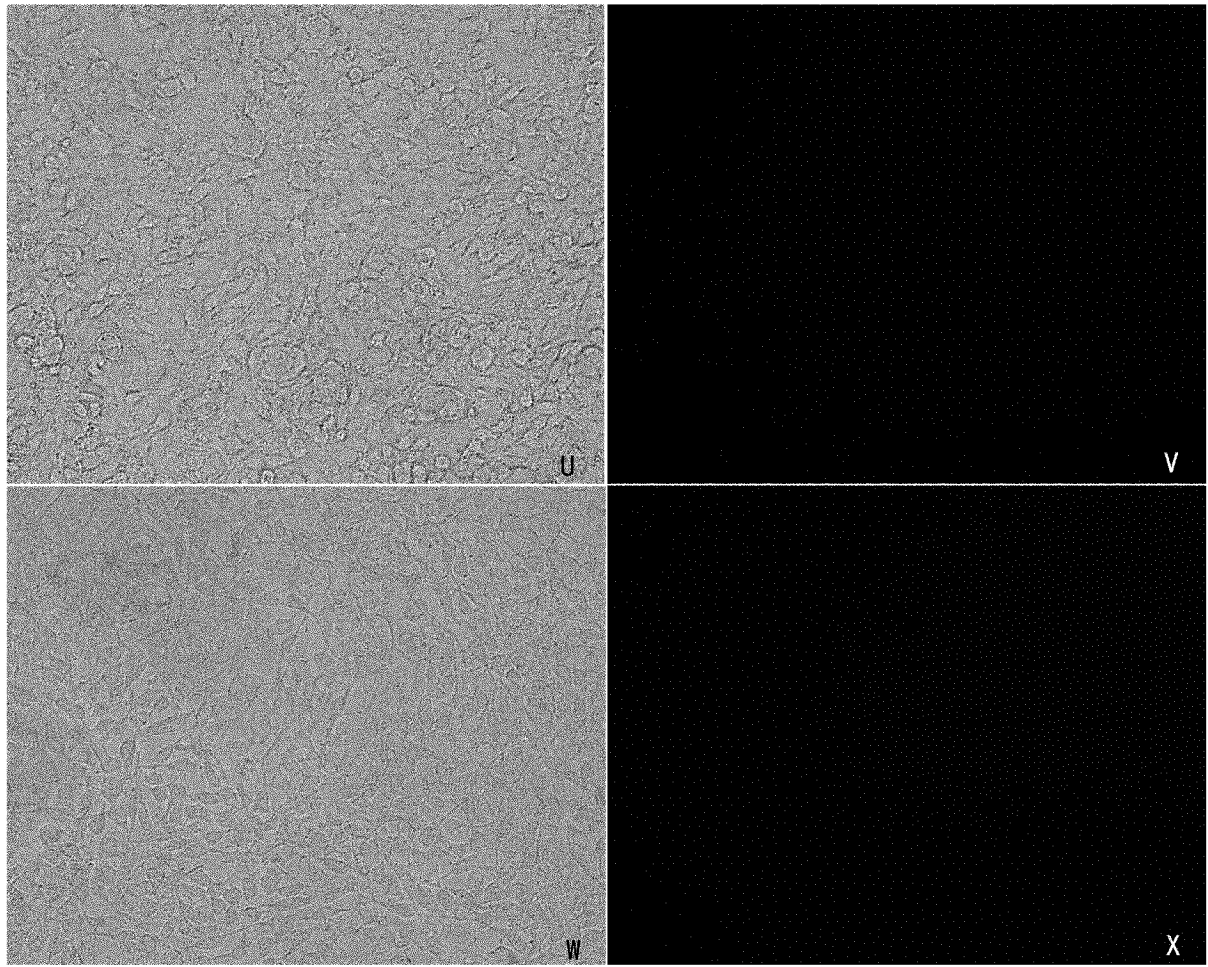


图 6

专利名称(译)	Caco-2细胞表面特异性结合的多肽及其筛选方法		
公开(公告)号	CN102127153A	公开(公告)日	2011-07-20
申请号	CN201010591851.X	申请日	2010-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	陕西师范大学		
申请(专利权)人(译)	陕西师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	陕西师范大学		
[标]发明人	侯颖春 王瀚 强荣兵		
发明人	侯颖春 王瀚 强荣兵		
IPC分类号	C07K7/08 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/533		
其他公开文献	CN102127153B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了Caco-2细胞表面特异性结合的多肽，利用噬菌体展示随机十二肽库筛选得到4条多肽片段，其氨基酸序列分别为：SPSIDTRYSLRG，CVSVGMKPSRP，SVSVGMKPSRP和MVSMDSSPRDL。本发明利用噬菌体多肽展示技术筛选结直肠癌Caco-2细胞结合的多肽序列，ELISA鉴定噬菌体克隆与结直肠癌细胞的亲和力，获得10个噬菌体克隆，测序获得4条多肽序列，其共有氨基酸序列为XXSXXXXXXXXRXX，同源性分析表明多肽基序可能为肿瘤细胞表面受体结合的配体蛋白上的氨基酸决定簇，细胞免疫荧光进一步鉴定噬菌体阳性克隆的靶向性结果提示噬菌体阳性克隆能够特异性结合Caco-2细胞，筛选获得的结肠癌Caco-2细胞特异性多肽为结直肠癌的早期诊断、抗肿瘤药物的靶向运输及靶向短肽药物的研发提供初步的实验依据。

