



## 从噬菌体随机十二肽库中筛选乙酰胆碱酯酶的抑制肽

乙酰胆碱酯酶(AChE)是神经系统重要的水解酶类,负责快速水解胆碱能突触释放的乙酰胆碱,中断神经冲动的传递。AChE抑制剂可用于治疗早老性痴呆、重症肌无力等疾病[1]。噬菌体肽库展示技术是20世纪90年代初兴起的一项新技术,已被广泛地应用在与分子识别相关的领域,为抗原表位的模拟、细胞信号转导、蛋白质的抑制剂等研究提供了一个全新的思路和先进的技术平台[2]。本研究以人AChE为筛选配基,拟从噬菌体随机12肽库中筛选出能抑制AChE的小分子拮抗剂。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

噬菌体随机12肽库、宿主菌*E. coli* ER2738均购自New England Biolabs公司;人红细胞膜AChE(1 g/L, 1200 IU/mg)购自Sigma公司;抗M13噬菌体抗体购自Pharmacia公司;羊抗鼠HRP-IgG购自华美公司;96孔酶联板购自丹麦Nunc公司;其余化学试剂均为分析纯。

#### 1.2 亲和筛选

参照New England Biolabs说明书,共筛选3轮。人红细胞膜AChE的3轮包被量依次为10、1、0.1  $\mu\text{g}$ ,经封闭液封闭后洗涤。第一轮投入原噬菌体肽库10  $\mu\text{l}$ ,感染细菌ER2738,扩增获得第一轮人AChE筛选噬菌体库,再重复筛选2次。3轮筛选区别仅在于人AChE包被量的改变。

#### 1.3 噬菌体滴度的测定

将待测噬菌体进行系列稀释,取10  $\mu\text{l}$ 噬菌体与200  $\mu\text{l}$ 对数生长期的菌液混匀,室温培养5 min。将上述感染噬菌体的细菌与3 ml顶层琼脂糖混匀,立即铺到37  $^{\circ}\text{C}$ 预热的LB/IPTG/X-gal平板上,室温放置凝固后,37  $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。次日数出空斑数目,乘以稀释倍数,即每10  $\mu\text{l}$ 原液的噬菌体滴度。

#### 1.4 噬菌体克隆与人AChE的结合实验

第3轮筛选结束后,随机挑选20个克隆,按照肽库试剂盒说明进行常规ELISA检测。以原库噬菌体和没有外源肽的M13噬菌体作为对照,每个样品设3个平行孔,邻苯二胺显色,测D490值。

#### 1.5 阳性噬菌体序列测定

扩增并纯化阳性噬菌体克隆,制备噬菌体单链DNA,送上海生工生物公司进行全自动测序。测序引物为5'-CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3'。

#### 1.6 噬菌体克隆的抑酶活性

筛选得到的5个噬菌体克隆进行滴度测定,取相同量与人AChE混合,然后按照微量羟胺比色法测定酶活性[3]。分别以未经过筛选的原噬菌体肽库和不加噬菌体肽库作为对照,同时设立空白阴性对照和只加酶液的正常酶对照管。以不加噬菌体的正常酶对照管的酶活性为100%计算抑制率。

## 2.1 筛选过程中噬菌体的回收率

3轮筛选中，逐渐降低人AChE的投入量，以获得能与AChE特异结合的噬菌体克隆。筛选结果回收率逐轮提高(表1)，显示较好的富集效果。

表1 每轮筛选噬菌体回收率

Tab.1 Recovery of the washed phages by biopanning

Round	Input (phage titer)(pfu)	Output (phage titer)(pfu)	Recovery (%)
1	$1.6 \times 10^{12}$	$4.5 \times 10^5$	$2.8 \times 10^{-2}$
2	$1.0 \times 10^{12}$	$3.2 \times 10^6$	$3.2 \times 10^{-4}$
3	$1.0 \times 10^{12}$	$4.2 \times 10^7$	$4.2 \times 10^{-3}$

## 2.2 噬菌体克隆与人AChE结合特异性测定

随机挑取第3轮筛选中得到的20个噬菌体克隆，进行ELISA分析。其中有6个克隆呈阳性，分别命名为L1、L2、L3、L4、L5和L6，ELISA结果显示这6个克隆能与AChE 特异性结合(图1)。

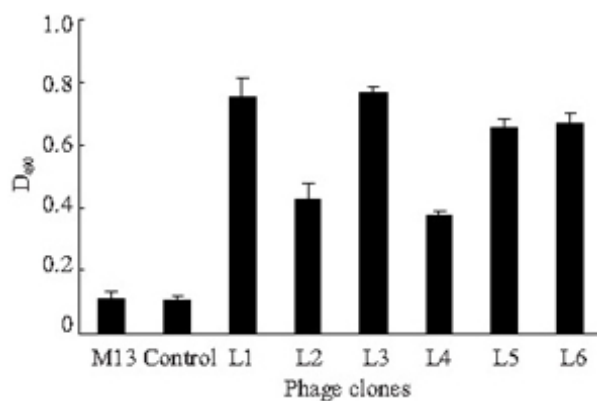


图1 ELISA 检测阳性克隆

Fig.1 Detection of the positive phage clones by ELISA

## 2.3 测序结果

制备上述6个阳性噬菌体克隆的单链DNA，经全自动测序，得到的序列分别如下，L1: STYWSHYG QQPY; L2: HWRYWHYPSETF; L3: WHYSWFSPYRT Y; L4: TWWPHYHSLPRV; L5和L6序列一致为: WHWTYGWRPPAM。其中保守序列为W(S/P)HY。

## 2.4 噬菌体克隆的抑酶活性

将噬菌体滴度为 $10^{11}$ 的各个噬菌体克隆取1  $\mu$ l 分别与AChE混合后，测定AChE的酶活性。AChE抑制实验显示除了L5外，其他噬菌体克隆L1、L2、L3和L4对AChE的活性均有抑制，抑制率分别为30%、22%、20%和28%。

## 3 讨论

迄今为止，AChE抑制剂多为小分子有机化合物，这些药物有肯定的疗效，但也有一定的副作用[4]。随着越来越多的多肽药物被批准上市，多肽药物研究愈来愈受到重视，例如Desjobert等[5]从噬菌体肽库中筛选出抑制HIV整合酶作用的多肽，为HIV的治疗提供新的研究思路。我们利用噬菌体展示技术筛选AChE的抑制

性多肽，为开发新型的治疗阿尔茨海默病药物的基础研究提供全新的思路和有力的支持。

噬菌体展示技术是一项利用丝状噬菌体表面表达外源蛋白的新技术。噬菌体随机肽库在诊断试剂、疫苗开发、分子药物等方面显示出广阔的应用前景。为了寻找AChE的抑制性多肽，我们以人红细胞AChE为靶标，从噬菌体随机十二肽库中筛选AChE的结合肽。通过降低靶蛋白浓度等方法从噬菌体线性十二肽库中筛选到了与人AChE特异结合的噬菌体展示肽。6个阳性克隆通过自动测序，进行序列初步分析发现其保守序列为W(S/P)HY，而且在天然蛋白质结构中W、H、Y均为重要的功能性氨基酸，抑酶实验结果证实了含有该保守序列的噬菌体克隆L1~L4具有较好的抑酶活性，所以这些保守序列可能是一个AChE结合活性肽的功能序列；而不含保守序列的克隆L5和克隆L6序列一致，但没有抑酶活性，说明与AChE结合阳性克隆不一定与抑酶活性相平行。目前正在进一步合成多肽，进行多肽与酶结合的作用机制及结构和功能等方面的研究。

(责任编辑：黄开颜)

#### 参考文献：

- [1] Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase—new roles for an old actor[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2001, 2(4): 294–302.
- [2] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. *Science*, 1985, 228(4705): 1315–7.
- [3] 李凤珍, 孙曼霁. 微量羟胺比色法测量胆碱酯酶活性[J]. *军事医学科学院院刊*, 1986, 10(3): 211–4.
- [4] Ibach B, Haen E. Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's Disease[J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(3): 231–51.
- [5] Desjobert C, de Soultrait VR, Faure A, et al. Identification by phage display selection of a short peptide to inhibit only the strand transfer reaction catalyzed by human immunodeficiency virus type 1 integrase[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(4): 13097–105.