

## 用 T7 噬菌体展示筛选系统筛选与 p38 相结合的蛋白

李志杰袁靖华袁小卫袁秦清和袁浩袁鹏袁静珍袁小学刚袁善超袁亚伟袁克森袁勇渊第一军医大学病理生理学教研室和全军休克微循环重点实验室袁东 广州 510515 冤

**摘要**目的 用 T7 噬菌体筛选系统筛选与重要信号分子 p38 MAPK 结合的蛋白遥方法 以 p38 MAPK 为靶蛋白袁分别用不同的介质渊LISA 平板和 Ni-NTA 亲和树脂冤筛选 T7 人肝和人肺 cDNA 文库遥结果 选择 86 个第 4 轮筛选后的洗脱噬菌体单个噬斑克隆袁经 EDTA 处理后利用特异性 PCR 引物扩增插入片断袁回收 PCR 产物并进行测序袁将所得到的序列用 BLAST 软件搜索 GenBank 中的同源序列袁得到了 46 个编码蛋白的序列遥结论 T7 噬菌体展示筛选系统筛选新的结合蛋白简单尧快速尧有效遥

**关键词**蛋白质相互作用 筛选 T7 噬菌体 基因组项目

中图分类号 院-33 文献标识码 院 文章编号 院000-2588渊003冤1-1131-03

## Screening and identification of proteins interacting with p38 MAP kinase via T7 phage-display screening system

LI Zhi-jie, LIU Jing-hua, GONG Xiao-wei, QIN Qing-he, HUANG Hao, DENG Peng, WANG Jing-zhen, ZHAO Shan-chao, SUN Xue-guang, LIU Ya-wei, ZHAO Ke-shen, JIANG Yong

Department of Pathophysiology and Key Laboratory of Shock and Microcirculation of PLA, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract:** Objective To screen and identify proteins that interact with p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases by means of T7 phage-display screening system. Method His-tagged fusion protein of p38 MAP kinase was used to coat a 96-well ELISA plate and Ni-NTA resin, which served as the media for screening human lung and liver T7 phage cDNA libraries. Results After 4 rounds of biopanning, 86 independent plaques were selected and processed by EDTA. The inserted gene fragments from these plaques were amplified by PCR, the products purified by a gel recovery method. The sequences of the insertions were identified and analyzed with BLAST program in GenBank. Forty-six clones were found to encode proteins. Conclusion T7 phage-display screening system is convenient, rapid and effective for screening the P38 MAP kinase-binding proteins.

**Key words:** proteins; interaction; screening; T7 phage display; human genome project

噬菌体展示技术是寻找与靶蛋白 渊靶蛋白冤有结合关系的多肽或蛋白的有效方法遥其原理是以靶蛋白为诱饵袁通过结合 - 洗脱 - 扩增 3 个步骤袁筛选噬菌体 cDNA 文库袁获得与靶蛋白结合的多肽或蛋白遥

T7 噬菌体筛选系统可简单尧快速地筛选出相当长度的多肽或蛋白质袁本研究利用 T7 噬菌体展示筛选系统袁以丝裂原活化蛋白激酶 渊MAPK冤信号转导通路中的 p38 作为靶蛋白袁筛选了与其有结合关系的多肽或蛋白袁并对获得的结果和筛选方法进行了初步探讨遥

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 主要仪器及试剂 PCR 仪 渊德国 Biometra 公司冤冤ABI 310 型 DNA 测序仪 渊美国 PE 公司冤冤微量 DNA/RNA 定量仪 渊瑞典 Pharmacia 公司冤冤低温离心机 渊美国 Beckman 公司冤冤

DNA 纯化回收试剂盒 渊itagene 公司冤冤PolyA Tract System 1000 mRNA 提取试剂盒 渊美国 Promega 公司冤冤7select 10-3 OrientExpress cDNA 文库构建试剂盒 渊Novagen 公司冤冤LB 培养基 渊ibco冤冤异丙基 - 茁D- 硫代半乳糖苷 (IPTG袁袁华运公司进口分装冤冤Ni-NTA 亲和树脂 渊Qiagen 公司冤冤LISA 板 渊orning 公司冤冤引物合成 渊上海申友生物技术公司冤冤羧苄青霉素 渊Novagen 公司冤冤100 bp DNA ladder 渊NEB 公司冤冤其它试剂均为国产分析纯或试剂盒附带遥

1.1.2 人肝组织和人肺文库 人肝组织来自肝胆结石左半肝切除手术患者 7 人肺 cDNA 文库购自 Novagen 公司袁包含有 3.1伊10<sup>7</sup> 个独立克隆袁并附带宿主菌 BLT5615 遥

收稿日期 院003-03-01

基金项目 院国家自然科学基金杰出青年基金 渊9925014冤冤国家自然科学基金重点项目 渊0030060, 39830400冤

Supported by National Natural Science Foundation for Outstanding Young Scientists (39925014); Key Projects of National Natural Science Foundation of China (30030060, 39830400)

作者简介 院李志杰 渊978-冤男袁山西大同人袁硕士袁电话 院20-61640114-89103

通讯作者 院姜 勇袁电话 院20-61648231袁e-mail: yjiang@public.guangzhou.gd.cn

1.2 方法

1.2.1 T7 载体 / 人肝 cDNA 文库的构建

1.2.1.1 mRNA 的分离 用试剂盒 PolyAtract System 1000 提取人肝组织 来源于肝胆结石部分肝切除的肝组织 mRNA 具体步骤详见操作手册

1.2.1.2 T7 人肝 cDNA 文库的构建 按照 Novagen 公司 T7Select10-3 OrientExpress cDNA 文库构建试剂盒说明书进行最后获得了 5伊0<sup>6</sup> 个独立克隆的 T7 人肝 cDNA 文库

1.2.2 准备靶蛋白 p38

1.2.2.1 酶标板的包被 dH<sub>2</sub>O 洗酶标板数次用 dH<sub>2</sub>O 或 TBS 稀释靶蛋白 p38 10 mg/ml 将稀释的 p38 或 S 蛋白加入酶标板孔中 100 ml/ 孔 室温 3~4 h 或 4 益过夜 用 300 ml 1伊BS 或 dH<sub>2</sub>O 洗 3 次 加入 5% 封闭液 100 ml/ 孔 室温 1 h 或 4 益过夜 用 dH<sub>2</sub>O 洗板 4 次 加入 dH<sub>2</sub>O 200 ml/ 孔 盖板 益 储备用

1.2.2.2 靶蛋白亲和树脂的准备 将带有 6伊His-Tag 的靶蛋白 p38 与 Ni-NTA 树脂结合 用 5% 脱脂奶粉 封闭过夜 备用

1.2.3 筛选和扩增噬菌体

1.2.3.1 筛选 取 BLT5615 在 50 ml LB 培养基中培养 直到 D<sub>600</sub>=0.5~0.6 用 根据已扩增文库的滴度和期望筛选的噬菌体数目计算第一轮筛选所需的噬菌体裂解液的体积 根据计算的结果将噬菌体裂解液加入已包被的板中或结合靶蛋白的 Ni 亲和树脂中 在室温下放置 30 min 或 4 益过夜 用 1伊BST 洗板 5 次

1.2.3.2 洗脱 加入 200 ml T7 洗脱缓冲液 室温放置 10~20 min 将洗脱的噬菌体转移到 15 ml 消毒管中

1.2.3.3 扩增 取 250 ml 洗脱噬菌体加入到 50 ml 新培养的菌液中 7 益 菌液直到细菌裂解 3 h 将裂解的菌液转移到一干净的 50 ml 离心管中 1000 g 伊 10 min 再将上清转移到另一干净的管中 益 储备 为下一步生物筛选做准备 如此反复 结合 - 洗脱 - 扩增 通过 3~4 轮筛选直到洗脱的噬菌体滴度稳定在一定数量级 挑取单个噬菌斑

1.2.4 测序及其数据分析 用吸头挑取单个噬菌斑的顶层琼脂放入一个含 100 ml 10 mmol/L EDTA pH 8.0 的试管中 短暂混悬 5 益 加热 10 min 室温冷却 14 000 伊 离心 3 min 取 1~2 ml 作为模板进行 PCR 反应 PCR 扩增的上游引物为 5'-GGAGCTGTCG-TATTCCAGT-3' 下游引物为 5'-TTGGGGAGTTCTGGCAAAT-3' 用 ExTaq 聚合酶进行 PCR 反应 5 益 15 s 5 益 5 s 7 益 30 s 共 35 个循环 2 益 延伸 10 分钟 扩增完成后 用 1% 琼脂糖电泳检查反应产物 回收 PCR 产物 用 T7 Up 引物进行测序分析 将

获得的序列在美国国立卫生研究院 的 GenBank 数据库中进行同源序列比较

2 结果

2.1 生物筛选

2.1.1 以不同介质筛选 T7 人肝 cDNA 文库的结果

平板筛选时 经过 4 轮的生物筛选 第 2 至 4 轮洗脱的噬菌体量均达到 1伊0<sup>7</sup> pfu/ml 噬菌体的投入和洗脱数量及富集情况见表 1 可以看出 随着筛选次数增加 投入产出比例趋于稳定 表明筛选已接近饱和状态 绝大部分噬菌体克隆可与靶蛋白 p38 发生相互作用

表 1 不同轮次 p38 包被平板筛选时噬菌体的投入量和产出量 pfu/ml

Tab.1 Phage input and output of different rounds of biopanning with p38-coated plate (pfu/ml)

Rounds	Input	Output	Input-output ratio
1	1.2伊0 <sup>12</sup>	5.6伊0 <sup>5</sup>	2.1伊0 <sup>6</sup>
2	8.2伊0 <sup>11</sup>	1.1伊0 <sup>7</sup>	7.5伊0 <sup>4</sup>
3	2.2伊0 <sup>12</sup>	2.2伊0 <sup>7</sup>	1.0伊0 <sup>5</sup>
4	1.7伊0 <sup>12</sup>	2.5伊0 <sup>7</sup>	6.8伊0 <sup>4</sup>

用靶蛋白亲和树脂 100 ml 进行筛选时 经过 4 轮的生物筛选 第 2 至 4 轮洗脱的噬菌体量均达到 108 pfu/ml

表 2 不同轮次 p38 蛋白亲和树脂筛选时噬菌体的投入量和产出量 pfu/ml

Tab.2 Phage input and output of different rounds of biopanning with p38 Ni-NTA resin (pfu/ml)

Rounds	Input	Output	Input-output ratio
1	2.2伊0 <sup>12</sup>	1.7伊0 <sup>7</sup>	1.3伊0 <sup>5</sup>
2	6.5伊0 <sup>12</sup>	2.4伊0 <sup>8</sup>	2.7伊0 <sup>4</sup>
3	3.2伊0 <sup>12</sup>	3.7伊0 <sup>8</sup>	8.7伊0 <sup>3</sup>
4	5.4伊0 <sup>12</sup>	3.5伊0 <sup>8</sup>	1.5伊0 <sup>4</sup>

2.1.2 筛选 T7 人肺 cDNA 文库的结果 筛选 T7 人肺 cDNA 文库的过程同筛选 T7 人肝 cDNA 文库 噬菌体的投入和洗脱数量及富集情况二者相比无显著差异 数据未列出

2.2 测序结果分析

我们使用上述两种不同介质 以 p38 蛋白为诱饵 分别筛选了人肝和人肺 cDNA 文库 一共选择了 86 个第 4 轮筛选后的洗脱噬菌体 单个噬斑克隆 经 EDTA 处理后利用特异性 PCR 引物扩增 插入片段得到的片段大小在 200 bp~1 000 bp 之间 用 1% 琼脂糖电泳后回收 PCR 产物 进行测序 将所得到的序列用 BLAST 软件搜索 GenBank 中的同源序列 得到了 46 个编码蛋白的序列

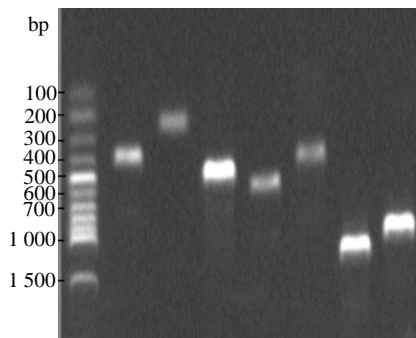


图 1 应用 4 轮筛选后的噬菌斑为模板 PCR 扩增后的电泳结果

Fig.1 Results of PCR amplification of the plaques after 4 rounds of biopanning

### 3 讨论

随着破译生命密码的人类基因组计划的完成,一个以揭示蛋白质结构与功能为研究重点的后基因组时代已经到来。蛋白质的结构决定蛋白质的功能,而蛋白质功能的发挥在很大程度上依赖于蛋白质之间的相互作用。建立高效、快速的方法检测蛋白质间的相互作用已成为迫在眉睫的任务。酵母双杂交和噬菌体展示技术是目前用于研究蛋白质间相互作用的主要筛选方法。与酵母双杂交相比,噬菌体展示筛选系统在筛选新的作用蛋白时更为简单、高通量,更适用于不能用酵母双杂交研究的膜蛋白和转录因子。以往的噬菌体展示载体多以 M13 为载体,仅能展示长度为 20 个氨基酸残基以内的寡肽或多肽,不能用于展示结构复杂的蛋白质。最近,由 Novagen 公司构建的 T7 噬菌体载体是将外源基因序列插入到编码 T7 噬菌体包膜蛋白基因中,插入片段长度在 300~3 000 bp 之间,所表达的多肽或蛋白以与噬菌体包膜蛋白融合的形式展示在噬菌体表面,大小在 50~1200 个氨基酸。T7 噬菌体展示文库可以展示相当部分表达的蛋白质,甚至可以保持蛋白一定的构象。因此,该系统最大程度地再现了细胞内的真实情况。新筛选出的结合蛋白与自然状态较为接近。另外,由于 T7 噬菌体生长速度快,整个筛选过程可在 1~3 天内完成。我们用 p38 MAPK 分别筛选了 T7 人肝和人肺 cDNA 文库,测序分析了 86 个筛选到的克隆,得到了 46 个编码蛋白的序列。在这些蛋白中有激酶、转录因子、细胞骨架相关蛋白和离子通道相关蛋白等。这提示 p38 可能具有比较复杂的细胞功能。前期多项细胞功能研究证明,如果两个蛋白质相互作用,那么它们一般参与相同或相关的细胞活动。例如,在不同筛选条件下多次重复的 B-68 是一个基因转录抑制因子,提示 p38 除了通过磷酸化修饰某些转录因子诱导靶基因表达上调外,还可能通过与基因转录抑制

因子的相互作用抑制或减少某些基因的表达,从而有利于细胞完成应激刺激条件下的特殊功能。如果上述假设能获得证实,对进一步了解 MAPK 信号转导通路的复杂功能和调节机制具有重要的意义。

在筛选噬菌体文库时通常采用聚苯乙烯材料制成的 ELISA 平板作为固定靶蛋白的介质。靶蛋白通过疏水键或共价键结合在平板上,在结合时靶蛋白可能需要变形以暴露内部的疏水键。采用  $\text{Ni}^{2+}$  或谷胱甘肽 S-转移酶(GST)亲和树脂作为固定靶蛋白的介质时,靶蛋白通过 His-Tag 或 GST-Tag 与亲和树脂结合,蛋白的结构更接近自然状态。因此,我们认为用亲和树脂作为介质筛选优于平板筛选。

噬菌体展示筛选系统是用来筛选新的结合蛋白的一个非常简单、有效的手段。该技术,在蛋白质相互作用中的成功应用,有望在人类功能基因组学和蛋白质组学研究中发挥重要作用。

### 参考文献

- 潘哲 Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 2002, 405(15): 837-46.
- 潘哲 Danner S, Belasco JG. T7 phage display: A novel genetic selection system for cloning RNA-binding proteins from cDNA libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(23): 12954-9.
- 潘哲 Santi E, Capone S, Mennuni C, et al. Bacteriophage lambda display of complex cDNA libraries: a new approach to functional genomics. *J Mol Biol*, 2002, 296(2): 497-501.
- 潘哲 吕海, 郑燕芳, 金大地. 应用激光显微分离技术在骨肉瘤组织原位筛选噬菌体文库. *第一军医大学学报*, 2002, 22(12): 1079-80.
- L 谢 H, Zheng YF, Jin DD. Application of laser capture microdissection in screening phage-display peptide library from osteosarcoma tissues. *J First Mil Med Univ/ Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(12): 1079-80.
- 潘哲 郭海萍, 罗海波, 刘艳君, 等. 利用噬菌体文库筛选可结合 TNF- $\alpha$  的短肽序列. *第一军医大学学报*, 2002, 22(7): 597-9.
- Guo HP, Luo HB, Liu YJ, et al. Screening of tumor necrosis factor- $\alpha$ -binding peptides by phage display peptide library. *J First Mil Med Univ/ Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(7): 597-9.
- 潘哲 van der Vlag J, den Blaauwen JL, Sewalt RG, et al. Transcriptional repression mediated by polycomb group proteins and other chromatin-associated repressors is selectively blocked by insulators. *J Biol Chem*, 2000, 275(1): 697-704.
- 潘哲 Jiang Y, Chen C, Li Z, et al. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38b). *J Biol Chem*, 1996, 271(30): 17920-6.
- 潘哲 郭爱华, 龚小卫, 阚文宏, 等. p38 丝裂原激活蛋白激酶对人胚胎肾 293 细胞一氧化氮合酶基因转录的调控. *第一军医大学学报*, 2003, 23(3): 206-9.
- Guo AH, Gong XW, Kan WH, et al. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene transcription by p38 mitogen-activated protein kinase in human embryonic kidney 293 cells. *J First Mil Med Univ/ Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2003, 23(3): 206-9.