

噬菌体肽库筛选隐丹参酮高亲和性结合肽

龙 军¹, 袁冬平^{2*}, 陆 茵³, 林 洁⁴

(¹南京中医药大学药学院, 南京 210023; ²南京中医药大学药理学教研室, 南京 210023; ³南京中医药大学江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 南京 210023; ⁴云南大学生命科学学院, 昆明 650091)

摘 要 通过噬菌体十二肽库, 以隐丹参酮为靶分子, 筛选与隐丹参酮具有高亲和性的结合短肽。经过噬菌体十二肽库的3轮淘选, 获得阳性噬菌体克隆, 挑选结合力强的克隆进行测序, 得到隐丹参酮的高亲和性结合短肽序列, 并进行生物信息学分析。本试验共筛选到10个隐丹参酮的高亲和性结合短肽序列, 有614种蛋白质与其结构相匹配。多肽序列的核心序列为VILDFGEI。本研究获得了与隐丹参酮结合的高亲和性多肽, 为深入研究隐丹参酮的作用靶点以及分子作用机制提供了实验依据和结构基础。

关键词 隐丹参酮; 噬菌体肽库; 多肽; 生物信息学

中图分类号 Q516; Q782; R318.04

文献标志码 A

文章编号 1000-5048(2013)05-0465-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20130516

Screening of high affinity peptides binding to cryptotanshinone with phage display peptide library

LONG Jun¹, YUAN Dongping^{2*}, LU Yin³, LIN Jie⁴

¹College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023; ²Department of Pharmacology, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023; ³Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029; ⁴School of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China

Abstract To screen peptides with high affinity to cryptotanshinone, using cryptotanshinone as a ligand, phage clones binding to cryptotanshinone were screened with phage display 12-mer peptide library through three rounds of biopanning. After binding activity was measured by ELISA, the phage clones displaying high affinity to cryptotanshinone were selected and amplified. DNAs of phage clones were extracted and sequenced, and the coding peptide sequences were analyzed by bioinformatics. Amino acid sequences of 10 positive clones with high affinity to cryptotanshinone were identified. 614 proteins matched partially to the peptide found by homological retrieval with BLAST. The core peptide sequence VILDFGEI was deduced by this study. Peptides with high affinity to cryptotanshinone were obtained through the experiment, which provided experimental evidence and structural foundations for further study of the targets of effects and molecular mechanisms of actions of cryptotanshinone.

Key words cryptotanshinone; phage display peptide library; peptide; bioinformatics

This project was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81173174); the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. SBK201241602); and the Natural Science Foundation of Jiangsu Higher Educational Institutions (No. 11KJB360004)

隐丹参酮(cryptotanshinone)是活血化瘀中药丹参的效应成分之一。研究表明,脂溶性的隐丹参酮具有独特的药理活性,包括抑制胆碱酯酶、抗感

染、抗氧化、抗菌、抗肿瘤和抗血小板聚集活性等^[1-7]。隐丹参酮可能通过多靶点、多途径、多环节的方式产生广泛的药理作用。但是,目前隐丹参

* 收稿日期 2013-06-26 * 通信作者 Tel:025-85811515 E-mail: annieyuan99@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81173174);江苏省自然科学基金资助项目(No. SBK201241602);江苏省高校自然科学基金资助项目(No. 11KJB360004)

酮在体内的作用靶点和作用途径的相关信息尚不明确。

噬菌体展示技术是将编码多肽的外源 DNA 与噬菌体表面蛋白的编码基因融合后,以融合蛋白的形式呈现在噬菌体的表面,被展示的多肽可保持相对的空间结构和生物活性。该技术具有库容量大、结合特异性强、表型与基因型统一等特点。因此,利用该技术可以从噬菌体展示文库中筛选出与细胞、受体、抗体、核酸以及某些化合物结合的肽段,现已成为药物筛选的实用性工具,主要用于受体新型配体的筛选、寻找酶抑制剂、具有治疗活性的抗体的筛选、抗原表位分析、药物靶点筛选等^[8]。本研究旨在利用商业化的噬菌体随机十二肽库对隐丹参酮的高亲和性结合短肽进行筛选,并运用生物信息学方法进行短肽序列的同源性分析和结合位点的特征分析,预测隐丹参酮可能具备的其他药理作用,为深入开展隐丹参酮的作用靶点以及分子作用机制研究提供实验依据和结构基础。

1 材料

1.1 试剂

噬菌体展示十二肽库试剂盒[美国 New England Biolabs 公司,其中包括:随机十二肽噬菌体展示文库(1.5×10^{13} pfu/mL),受体菌 *E. coli* ER2738 宿主菌];隐丹参酮(西安融升生物科技有限公司, HPLC 纯度大于 98%);紫胶(上海典品工贸有限公司,纯度大于 99%);聚乙二醇 8000 (PEG 8000),*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF),异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG),5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D 半乳糖苷(X-gal)(美国 Amresco 公司);牛血清白蛋白(BSA, 美国 Roche 公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗 M13 单克隆抗体(瑞典 Pharmacia 公司)。

1.2 仪器

JA2003N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司);Multiskan GO 酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 隐丹参酮的包被

称取紫胶少许,置于干锅中加热熔化,迅速置于 60 mm \times 15 mm 培养皿底部(保持厚度约

1 mm)。在胶凝固前于胶表面迅速均匀加入隐丹参酮 0.5 g。待胶自然冷却后,用双蒸水洗涤培养皿多次,以去除多余的隐丹参酮。覆以保鲜膜于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置备用。

2.2 菌株培养

将 *E. coli* ER2738 甘油菌划线接种于 LB-Tet 平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜活化。次日,取 LB 液体培养基(四环素质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$) 5 mL 于试管中,加入体积分数为 1% 的过夜培养菌液,摇床(37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min)培养至对数中期($A_{600} \approx 0.5$)用于后续实验。

2.3 阳性噬菌体克隆筛选

将包被隐丹参酮的培养皿用封阻缓冲液[0.1 mol/L NaHCO_3 (pH 8.6), 5 mg/mL BSA, 0.02% NaN_3]封闭过夜。TBST(TBS, 含 0.1% Tween-20)缓冲液快速洗板。稀释噬菌体文库,并将其加入包被隐丹参酮的培养皿,使噬菌体与隐丹参酮充分结合。再用 TBST 洗涤,除去未与隐丹参酮结合的噬菌体。用非特异性缓冲液[0.2 mol/L Glycine-HCl (pH 2.2), 1 mg/mL BSA]分离已与隐丹参酮结合的噬菌体。对洗脱物进行扩增:将洗脱液加入对数生长的 *E. coli* ER2738 培养液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4.5 h。培养物 10 000 r/min,离心 10 min,将 80% 上清液转入 Eppendorf 管中,加入 1/6 体积的 PEG/NaCl,噬菌体 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜沉淀。将 PEG 沉淀离心 15 min。沉淀物再重悬于 TBS 1 mL 中,悬液转入微量离心管中,离心 5 min,上清液转入另一新鲜离心管,用 1/6 体积的 PEG/NaCl 再沉淀,冰上孵育 60 min,离心 10 min。将沉淀物重悬于 TBS 200 μL , 0.02% NaN_3 中,此即为扩增的洗脱物。重复以上结合-扩增循环 2 次,即可获得高度富集的噬菌体。每轮筛选均测定噬菌体的滴度。

2.4 噬菌体的滴度测定

接种 ER2738 单菌落于 LB 培养基 5 mL 中,摇床培养至对数中期。每个无菌的培养管中加入融化的顶层琼脂 3 mL,保存于 45 $^{\circ}\text{C}$ 备用。在 LB 培养基中准备 10 倍系列稀释的噬菌体洗脱物。当菌体培养物达到对数生长中期,分成 200 μL 于微量离心管中,每管加入不同稀释度的噬菌体 10 μL ,迅速振荡混匀,室温孵育 5 min。将感染细胞转入 45 $^{\circ}\text{C}$ 预热的顶层琼脂中,快速混匀,立即倒入 37 $^{\circ}\text{C}$ 预温的 LB/IPTG/X-gal 培养板上。平板冷却

后,倒置,37℃培养过夜。计数有约100个噬菌斑的培养板上的蓝斑数。然后用此数目乘以稀释倍数即得到每10微升噬菌体的空斑形成单位滴度(pfu)。

2.5 结合活性的测定

从第3轮筛选出的噬菌体库中挑取10个克隆分别进行扩增,测定其与隐丹参酮的结合活性。按“2.1”项下方法进行隐丹参酮的包被、封闭。2h后弃去封闭液,TBST洗板6次,每孔加入噬菌体克隆100μL,室温结合2h。再次洗板,然后加入酶标抗M13单抗(1:5000)200μL,室温结合1h,洗板。每孔加入ABTS显色液200μL,室温显色30min,测量 A_{405} 。以随机挑取的噬菌体筛选第一轮中未结合的噬菌体克隆做对照。

2.6 快速纯化噬菌体测序模板及测序

用无菌牙签挑取蓝色噬菌斑,转入1:100稀释的培养液3mL中,37℃孵育4.5h。将培养物移入离心管中,离心30s。取上清液再离心,将上清液500μL转入新鲜离心管中。加PEG/NaCl 200μL,颠倒混匀,室温放置10min。12000r/min离心10min,弃上清液。短暂离心,小心吸去残余上清液。沉淀物充分重悬于碘化物缓冲液100μL中。加入无水乙醇250μL,室温温育10min。12000r/min离心10min,弃上清液。用70%冰乙醇洗沉淀,再次离心,去上清液,短暂真空干燥。沉淀重悬于双蒸馏水30μL中,送Invitrogen公司测序。测序引物为-96gIII(5'-HOCCCTCATAGTTAGCGTAACG-3')。

2.7 隐丹参酮结合位点的生物信息学分析

采用BLAST检索,把测到的序列分别与库中人类蛋白质数据库作比对,得到系列候选蛋白并分析其功能和结构域的特点。再将候选蛋白与多个药物靶点数据库PDTD(<http://www.dddc.ac.cn/pdtd/>)、DrugBank(www.drugbank.ca)、TTD(<http://bidd.nus.edu.sg/group/ttd/>)进行比对,分析隐丹参酮与候选靶点蛋白结合及治疗疾病的相关信息。

3 结 果

3.1 噬菌体的富集效果

每轮筛选前后均测定噬菌体的滴度。经过逐轮淘选,得到与隐丹参酮高亲和力的噬菌体克隆。与隐丹参酮反应时,将加入的噬菌体量计为投入

量,洗脱得到的噬菌体量计为回收量,回收率(回收量/投入量)代表了富集程度。经3轮筛选后,噬菌体得到了有效的富集(表1)。

Table 1 Recovery of panning with phage display peptide library

Round	Phage input/pfu	Phage recycled/pfu	Recovery
1	1.5×10^{11}	1.0×10^5	6.67×10^{-7}
2	3.5×10^{11}	2.6×10^6	7.43×10^{-6}
3	4.7×10^{11}	3.0×10^7	6.38×10^{-5}

3.2 结合活性实验

M13噬菌体克隆首先与包被固定的隐丹参酮发生结合反应,然后用TBST洗脱去除未与隐丹参酮结合的噬菌体,再用酶标抗M13单抗结合噬菌体,经ABTS显色即可通过吸收度的大小来判断噬菌体与隐丹参酮的结合情况。阴性对照是未与隐丹参酮结合的噬菌体克隆,因此将先被洗脱掉,不会与酶标抗M13单抗结合、显色。本实验结果显示挑取的10个噬菌体克隆的 A_{405} 大于0.2,比阴性对照高10倍以上,表明该噬菌体多肽可与隐丹参酮特异性结合。

3.3 序列测定

随机挑取第3轮筛选出的10个阳性噬菌斑,扩增噬菌斑,纯化测序模板(即噬菌斑的单链DNA),经测序,得到十二肽的DNA序列。再根据噬菌体展示十二肽库试剂盒说明书中提供的简要遗传密码表,推测出十二肽的氨基酸序列,见表2。运用多序列对比软件Clustalo分析结果发现,其公共的核心序列是VILDFGEI。

3.4 隐丹参酮结合位点的生物信息学分析

通过对筛选的多肽的氨基酸序列进行BLAST的检索分析,找到614个含有类似短肽序列的蛋白质。这些蛋白质与筛选的多肽有数量不等的匹配位点,最多的匹配位点有8个。进一步检索这些蛋白质发现,有些蛋白质具有明确的功能和结构域。如signal transducer and activator of transcription 3(STAT3),其序列中有8个氨基酸与多肽序列一致,结构域中的SH2域有明确的疏水结合口袋,其关键的结合氨基酸是V和I。由于隐丹参酮结合的核心序列也包含V和I,由此推测,隐丹参酮可能倾向于与STAT3蛋白中的疏水结合口袋结合,从而影响其靶基因的转录。而有些蛋白质虽然序列已知,但功能和结构域尚不清楚。此外,从核心序列的氨基酸组成可见,共含有5个疏水性氨基

酸、2个亲水性氨基酸和1个中性氨基酸,表明隐丹参酮的结合肽段具有较强的疏水特性。

将 BLAST 检索到的蛋白质纳入药物靶点数据库进行检索发现,只有7个蛋白质是在研或已知的药物靶点,它们是 STAT3, ITPR2, ATR, Kcnk18,

MAGE-2, ABCA1 和 mTOR。这些蛋白质主要涉及肿瘤、心血管疾病和免疫性疾病(表3),提示隐丹参酮治疗的疾病可能也以这些疾病为主,这与当前隐丹参酮主要用于治疗肿瘤和心血管疾病的研究现状相符。

Table 2 DNA and amino acid sequence of dodecapeptides

Number	DNA sequence	Amino acid sequence
1	GTGATTTTGAATATGCTCTTTTGATGGTGCTGAGATT	VILNMSFDGAEI
2	GTGGATTCTTTTGCTGAGATTTTGATTATGTATAAG	VDSFAEILIMYK
3	GTGATTGATTTTGGTGAGGTTGCTATGGAGATTCGT	VIDFGEVAMEIR
4	ATTCTGTGGAGTTGTTGAGATTGATGGTTATATT	ISVELFEIDGYI
5	GTGATTTCTATGTTGATGGTGTGCTGCTCGTTCT	VISMLMVFAGRS
6	GCTGAGCGTGTGATTTTGATGGAGATTGTTGTTGGT	AERVILMEIVFG
7	TTGGTGAATTCTGAGATTTTGGATGGTATTATGCAT	LVNSEILDGIMH
8	TTTGATCAGATGGTGATTTTGTGTTGATTTGATCGCT	FDQMVLFDLMR
9	GTGGAGATTTTGATGTTTGATGGTGAGATTTTGAAT	VEILMFDGEILN
10	GCTGAGGTGATTTTGCATTTTGCTATTTTGATGGAG	AEVILDFGILME

Table 3 Target proteins and related diseases and corresponding drugs

Target proteins	Related diseases and corresponding drugs
Signal transducer and activator of transcription 3 isoform 3	Cancers(RTA 402; Atiprimod); Ischemic injury (AVT-02 UE)
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2	Hypertension (Nitroprusside)
Serine/threonine-protein kinase ATR	Lymphoma; Solid Tumors; Colorectal Cancer (VX-689; VX-680); Immunosuppression (XL765; Temsirolimus)
Potassium channel subfamily K member 18	Hypertonicity of bladder (Glibenclamide); Cardiac arrhythmias; Sudden cardiac death (Tolazamide; Nateglinide); Migraine; Occlusive peripheral vascular disease (Sodium bicarbonate); Cardiac arrhythmias (Propafenone; HP-184); Cardiac arrhythmias (Nerispiridine; Indapamide); Convulsions (Retigabine); Irritation (Menthol); Vascular disease (Dronedaron; Azimilide); Noninsulin-dependent diabetes mellitus (Iptakalim); Autoimmune diseases; Immunosuppression (Psora-4)
Melanoma-associated antigen 2	Angiogenesis; Tumors; Head and neck squamous cell carcinomas
ATP-binding cassette sub-family A member 1	Cholestasis; Intrahepatic cholestasis (Quinidine barbiturate; Probuco); Acute myeloid leukemia (LY335979); Hypercholesterolemia
Serine/threonine-protein kinase mTOR	Melanoma; Pancreatic cancer; Malignant melanoma (Sorafenib; R7204); Immunosuppression (XL765; Temsirolimus); Stroke; Seizure; Breast cancer; Diabetes mellitus (XL418; VQD-002)

4 讨论

寻找药物的作用靶点是药物研发的重要组成部分。与传统的药物筛选方法相比,本研究采用的噬菌体肽库技术则具有容量大、亲和选择的范围广、淘选效率高、筛选周期短等优点^[8],使得噬菌体肽库技术在药物靶点筛选等方面发挥着重要作用。

本研究利用噬菌体十二肽库对隐丹参酮的作用靶点,即高亲和性的结合短肽进行了研究。经过3轮淘选后,随机挑取10个结合力强的噬菌体克隆测序。结果表明,VILDFGEI序列可能是隐丹参酮与肽段结合的核心序列。BLAST的检索分析发

现,614个蛋白质与筛选的多肽有匹配位点。其中,有相当一部分的蛋白质与筛选的多肽之间的E值太高,因而成为候选靶点蛋白质的可能性极低。氨基酸序列分析表明,VILDFGEI序列有62.5%的疏水性,提示隐丹参酮倾向于与疏水性的结构域发生结合。将筛选的蛋白质进一步纳入药物靶点数据库检索,结果显示,只有7个蛋白质是在研或已知的药物靶点,其他绝大多数蛋白质尚无药物进入研究阶段。目前已知这7个蛋白质主要涉及肿瘤、心血管疾病和免疫性疾病。而已知的隐丹参酮的研究也主要涉及肿瘤、心血管、内分泌、炎症等领域^[1-7],表明本研究方法具有一定的可靠性。

此外,从本研究的结果可以发现,噬菌体肽库

筛选的结果可能会拓展本研究对隐丹参酮作用的认识。以抗肿瘤作用为例,目前隐丹参酮作用的肿瘤细胞类型主要包括宫颈癌、胆管细胞癌、黑色素瘤、前列腺癌、横纹肌肉瘤和白血病。而筛选的结果显示,淋巴瘤、大肠癌、头颈部鳞状细胞癌、血管瘤、胰腺癌、乳腺癌等也可能是隐丹参酮作用的肿瘤类型。

另外,噬菌体肽库筛选的结果可能会推进对隐丹参酮作用机制的研究。综合文献报道和本研究的筛选结果,STAT3、mTOR 是已知的隐丹参酮作用的蛋白质分子^[7]。但隐丹参酮与其作用的具体方式并不清楚,而本研究从氨基酸序列的角度可能给出了解释,即隐丹参酮可能通过与其具有高亲和性的肽段发生结合,从而影响了肽段所归属的蛋白质的功能。同时,还有几个蛋白质分子可能也是隐丹参酮潜在的作用靶点,这些将在后续的实验研究中进行验证。综合以上分析,噬菌体肽库技术不仅为隐丹参酮的作用靶点筛选提供了强有力的支持,同时也为隐丹参酮的作用机制研究提供了丰富的数据,值得进一步推广应用。

参考文献

- [1] Zhao Y, Lu Y, Zheng SZ, *et al.* Research progress on pharmacological activities of cryptotanshinone [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2010, 25(11): 1 839 - 1 841.
- [2] Park IJ, Kim MJ, Park OJ, *et al.* Cryptotanshinone sensitizes DU145 prostate cancer cells to Fas (AP01/CD95)-mediated apoptosis through Bcl-2 and MAPK regulation [J]. *Cancer Lett*, 2010, 298(1): 88 - 98.
- [3] Ye Y, Xu W, Zhong W. Effects of cryptotanshinone on proliferation and apoptosis of Hela cell line of cervical cancer [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 35(1): 118 - 121.
- [4] Lin HC, Chang WL, Chen GL. Phytochemical and pharmacological study on *Salvia miltiorrhiza* (II)-cytotoxic activity of tanshinones [J]. *Chin Pharm J* (中华药理学杂志), 1991, 43(6): 501 - 504.
- [5] Chen W, Luo Y, Liu L, *et al.* Cryptotanshinone inhibits cancer cell proliferation by suppressing Mammalian target of rapamycin-mediated cyclin D1 expression and Rb phosphorylation [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2010, 3(8): 1 015 - 1 025.
- [6] Chen L, Zheng SZ, Sun ZG, *et al.* Cryptotanshinone has diverse effects on cell cycle events in melanoma cell lines with different metastatic capacity [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011, 68(1): 17 - 27.
- [7] Zhang Y, Jiang P, Ye M, *et al.* Tanshinones: sources, pharmacokinetics and anti-cancer activities [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(10): 13 621 - 13 666.
- [8] Wang J, Wang B. Phage display technology and its application in drug screening [J]. *Foreign Med Sci Pharm* (国外医学 药理学分册), 2003, 30(5): 257 - 261.

· 本刊讯 ·

《中国药科大学学报》网站再次荣获 “中国高校科技期刊优秀网站”称号

2013年10月12日,中国高校科技期刊研究会公布了第二届“中国高校科技期刊优秀网站”名单,《中国药科大学学报》网站继2011年获得首届“中国高校科技期刊优秀网站”称号后,再次位列其中。

在国际和国内出版界数字化和网络化快速发展的时代背景下,《中国药科大学学报》编辑部积极开展期刊数字化建设,建立了具有独立域名的网站,实现了便捷的网络化投审稿功能,提高了科技期刊编辑出版的效率,并加快了及科学成果的传播与交流。此次获奖是对《中国药科大学学报》编辑部在期刊数字化、网络化方面所做工作的再次肯定。《中国药科大学学报》编辑部将以此次获奖为契机,继续向国内外同行学习先进的数字化出版经验,进一步扩大刊物的影响,更好地服务于科学成果的传播与交流。

(本刊编辑部)