

展示 p53 蛋白表位噬菌体 phage-SD 的制备及应用

刘兴友^{1,2}, 孙梦月¹, 潘鹏涛², 刘国伟³

(1.河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007;2.新乡学院 生命科学与基础医学学院,河南 新乡 453003;
3.新乡市中心医院,河南 新乡 453099)

摘要:[目的]利用噬菌体展示技术制备一种可用于检测血清 p53 抗体的噬菌体.[方法]利用基因工程手段将编码 p53 蛋白 N 端 20~31 位的多肽 SD 的基因克隆到丝状噬菌体载体 fADL-le 的 pIII 蛋白基因中,制备展示该外源肽的噬菌体 phage-SD 并进行了 Western blot 鉴定.在此基础上,分别以 phage-SD 和重组 p53 蛋白为检测抗原,利用 ELISA 方法对乳腺癌患者血清 p53 抗体进行检测.[结果]成功制备出能特异性识别血清 p53 抗体的噬菌体 phage-SD.ELISA 检测结果表明,60 例乳腺癌患者中 phage-SD 检测到 13 例 p53 抗体阳性患者,检出率为 21.67%,与重组 p53 蛋白检测效率(21.67%)一致.[结论]成功制备一种灵敏度高、特异性强的可用于血清 p53 抗体检测的噬菌体 phage-SD,为新型血清 p53 抗体检测试剂的开发及临床应用奠定基础.

关键词:噬菌体展示;丝状噬菌体;p53 抗体;ELISA

中图分类号:R-33

文献标志码:A

自 1985 年美国科学家 SMITH 首次报道将核酸内切酶展示在噬菌体的表面并创立了噬菌体展示技术,并于 2018 年凭借该项研究获得诺贝尔化学奖^[1],噬菌体展示技术经过 30 多年的发展目前已广泛应用于生命科学、临床医学、环境科学等各个领域^[2-5].

丝状噬菌体是侵染大肠杆菌的一种无包膜杆状病毒,长约 900 nm,直径为 6 nm,内部为单链环状 DNA 基因组,表面被各种外壳蛋白所覆盖^[6].噬菌体表面的外壳蛋白由其基因组中相应结构蛋白基因编码,因此,通过将外源基因定向克隆到特定外壳蛋白基因中,可以用融合表达的方式,使感兴趣的外源蛋白或多肽展示在噬菌体的表面.理论上,噬菌体表面的所有外壳蛋白均可用于展示,但目前最常用的有两种外壳蛋白,分别是 pIII 蛋白展示系统和 pVIII 蛋白展示系统^[7].5 个拷贝的 pIII 蛋白位于噬菌体的尾部,直接参与噬菌体侵染大肠杆菌的过程.该展示系统具有对展示的外源肽的大小无严格限制的优点,完整的蛋白甚至抗体都可以通过该系统展示在噬菌体的表面,但其拷贝数相对较低^[8].成熟的 pVIII 蛋白大约由 50 个氨基酸构成,位于噬菌体的背部,每个噬菌体大约有 2 700 个拷贝.与 pIII 展示系统相比,外源多肽可以通过该系统以高拷贝的形式展示在噬菌体的表面,并刺激机体产生强烈的免疫应答反应,但该系统展示对外源肽的大小有限制,通常不超过 15 个氨基酸,否则会影响噬菌体的组装和形成.

肿瘤患者体内已发现多种针对胞内及胞外抗原的体液免疫应答反应,其中 p53 介导的体液免疫应答反应在肿瘤患者体内最为常见^[9-11].目前,抗体型肿瘤标志物的检测多以重组蛋白为检测抗原,存在制备烦琐、价格高昂且检测效率不高等问题^[12-13].噬菌体作为一种规则化的生物模板,利用噬菌体展示技术,可以在噬菌体表面展示不同的外源肽来识别不同的目标物,用于靶专一性的生物识别.

本研究以丝状噬菌体为模板,选择 p53 抗体为靶点,利用噬菌体展示技术将 p53 蛋白的关键表位多肽 SD

收稿日期:2022-03-28;修回日期:2022-04-25.

基金项目:国家自然科学基金(81702074);河南省科技攻关计划项目(212102110160);河南省高等学校重点科研项目(22A180008).

作者简介:刘兴友(1963—),男,重庆市人,新乡学院教授,博士,研究方向为预防兽医学,E-mail:xingyouliu63@163.com.

通信作者:潘鹏涛,E-mail:panpengtao126@163.com.

(SDLWKLLPENNV)展示在噬菌体表面,并初步检测乳腺癌患者血清中的 p53 抗体,为后续血清 p53 抗体检测试剂的开发及其临床应用提供数据支持.

1 材料和方法

1.1 载体及菌株

噬菌体载体 fADL-1e 购自美国 Antibody Design 公司(Catalog number:PD020);*E. coli* JM109 感受态购自北京索莱宝科技有限公司.

1.2 主要试剂及仪器

2×premix 预混液、限制性内切酶 *Bgl* I, DNA Marker, ECL 化学发光试剂盒均购自大连宝生物工程有 限公司;质粒小量提取及 DNA 凝胶回收试剂盒购自杭州爱思进生物技术有 限公司;引物合成及测序均由上海生物工程有 限公司完成;小鼠抗 M13 噬菌体 pⅢ 单克隆抗体购自北京 NEB 有 限公司;辣根过氧化酶 (HRP)标记羊抗小鼠 IgG 及 HRP 标记羊抗人 IgG 购自北京 Abbkine 公司;全波长酶标仪(Spectra max Plus 384)购自美国 MOLECULAR DEVICES;化学发光凝胶成像系统(Amersham Imager 680)购自美国 GE 公司;健康人及乳腺癌患者血清来自新乡市中心医院,所有血清收集均在患者知情同意的情况下收集的,且本实验是在新乡学院医学伦理委员会及新乡市中心医院伦理委员会批准的情况下进行的.

1.3 重组噬菌体载体 fADL-1e-SD 的构建

酶切噬菌体载体 fADL-1e;用 *Bgl* I 限制性内切酶对载体 fADL-1e 进行酶切,反应结束后琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切后的载体,并按照 DNA 凝胶回收试剂盒的说明回收和纯化酶切后的载体.噬菌体展示 SD 多肽的合成:首先合成编码 p53 蛋白 N 端第 20~31 位氨基酸 SDLWKLLPENNV 的两个互补 DNA 片段:5'-CGGCCATGGCATCAGACCTATGGAACTACTTCTGAAAACAACGTTGGCCCGGG-3', 5'-GGGC-CAACGTTGTTTTTCAGGAAGTAGTTTCCATAGGTCTGATGCCATGGCCGGCT-3',将两个互补的 DNA 片段等摩尔混合溶解,94 °C 变性 5 min,58 °C 复性 5 min,使两条互补的单链片段结合形成双链.SD 多肽片段与 fADL-1e 酶切载体的连接:将合成的 SD 多肽目的片段与 *Bgl* I 酶切后 fADL-1e 载体 16 °C 过夜连接,并将连接后的重组质粒转化到 JM109 感受态细胞.菌液 PCR 鉴定阳性克隆:挑取单克隆进行菌液 PCR 鉴定,引物和扩增条件如下:上游引物:5'-CCGTGCATCTGTCCTCGTTCAA-3';下游引物:5'-GTTTTTCAGGAAGTAGTTTCCATAGGTC-3';PCR 反应条件为:94 °C 预变性 6 min,94 °C 变性 35 s,56 °C 退火 35 s,72 °C 延伸 30 s,35 个循环;4 °C 保存.反应结束后,将筛选到的阳性克隆送至上海生物工程有 限公司进行测序确认,将构建成功的重组噬菌体载体命名为 fADL-1e-SD.

1.4 噬菌体 phage-SD 的制备及滴度测定

将 200 μL 测序正确的含有 fADL-1e-SD 的 JM109 接种到 200 mL 的 LB 液体培养基(100 mg/L Kar+)中,37 °C 震荡培养 10 h;4 °C,8 000 r/min 离心 10 min,保留沉淀;加入 50 mL 的 PEG/NaCl 溶液,混匀后,4 °C 冰箱过夜;次日,10 000 r/min 离心 15 min,保留沉淀;PBS 缓冲液溶解沉淀后,12 000 r/min 离心 1 min,保留上清;再次加入体积分数为 20% 的 PEG/NaCl 溶液,4 °C 下静置 5 h;12 000 r/min 离心 10 min, PBS 缓冲液溶解沉淀,4 °C 冰箱保存.

进行噬菌体 phage-SD 的滴度测定时,首先制备对数期(OD_{600} 约为 0.5)的 JM109 菌液,再取 10 μL 制备好的噬菌体悬液加到 90 μL 的 PBS 中混匀,此稀释度为 0.1,用 PBS 进行梯度稀释至 10^{-12} ,从 10^{-6} 至 10^{-12} 梯度中各取 10 μL 与 200 μL 处于对数期 JM109 菌液混匀,37 °C,静置 30 min,将菌液涂板,37 °C 倒置培养,同时取 200 μL 处于对数期 JM109 菌液涂布在卡那抗性平板作对照;次日,根据公式计算噬菌体滴度:滴度=菌落数/(接种噬菌体的体积×稀释度).

1.5 Western-blot 分析噬菌体 phage-SD

噬菌体蛋白经 SDS-PAGE 分离后,300 mA 电流电转 90 min,将蛋白转移到 PVDF 膜上,以商品化的鼠源 anti-pⅢ 单克隆抗体(NEB)或 p53 抗体阳性癌症患者血清或健康人血清为一抗,羊抗鼠 IgG 或羊抗人 IgG 为二抗,对 phage-SD 进行 Western-blot 分析.

1.6 血清 p53 抗体检测方法的建立

phage-SD-ELISA:将制备好的噬菌体 phage-SD 作为包被抗原,30 mg/L 包被酶标板,每孔 50 μL ,冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;次日,用 PBST 洗板 3 次,最后一次静置 5 min;加 200 μL 用 PBST 稀释的 5% 的脱脂奶粉,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h;PBST 洗板后加 50 μL 稀释比例为 1:200 的待检测的乳腺癌或健康人血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;PBST 洗板后加 50 μL 稀释比例为 1:5 000 HRP 标记羊抗人二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min;PBST 洗板后加 100 μL 四甲基联苯胺单组分显色液,避光条件下反应 10 min 后立即加入 50 μL ELISA 终止液,所有样本均采用复孔检测,OD₄₅₀ 波长下读取实验结果,并计算每个样本检测结果的平均值.健康人血清用于确定该检测方法的 cut-off 值,具体确定方法详见文献[6].p53-ELISA:以重组 p53 蛋白(购自 Abcam, Catalog number:ab82201)作为包被抗原检测血清 p53 抗体的方法简称为 p53-ELISA.除了酶标板上包被的抗原为 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的重组 p53 蛋白外,整个实验流程与 phage-SD-ELISA 完全相同.

1.7 统计学分析

所有数据采用 SPSS 13.0 软件包进行分析.乳腺癌患者组及健康人血清 p53 抗体检出率的比较采用四格表的 χ^2 检验. $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 重组噬菌体载体 fADL-1e-SD 的构建及鉴定

对酶切后的载体 fADL-1e 和 SD 序列连接,构建重组载体 fADL-1e-SD,如图 1 所示.

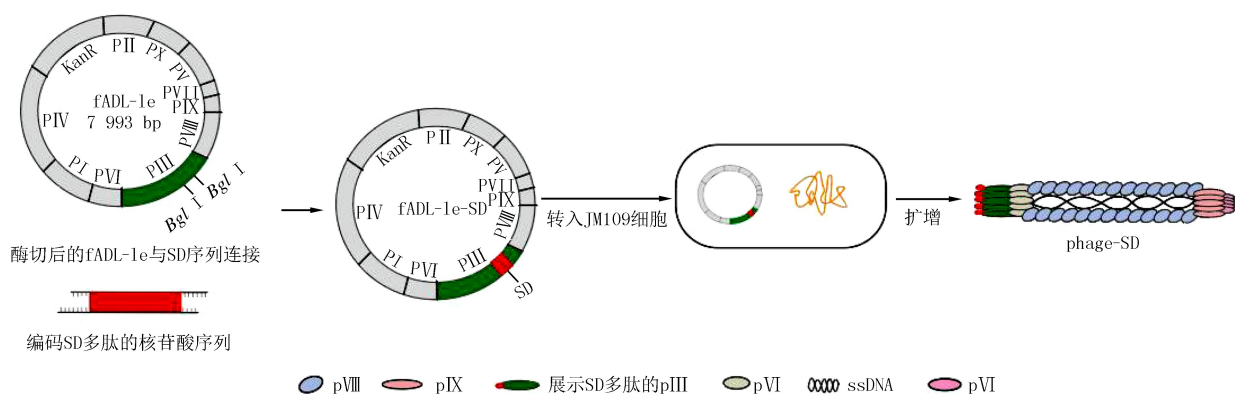


图1 phage-SD构建及制备示意图

Fig.1 Schematic diagram of the construction and preparation of phage-SD

对载体 fADL-1e 以及酶切后的载体 fADL-1e 进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果见图 2.fADL-1e 载体主要以线状的形式存在,酶切后电泳迁移速率比线状空载快,初步证明酶切成功.

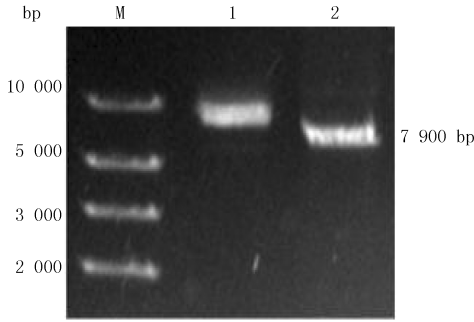
PCR 反应中上游引物在载体 fADL-1e 的 pIII 基因插入位点上游大约 700 bp 处,下游引物为连接片段的反义链,因此阳性克隆经 PCR 扩增后会在 700 bp 处出现特异条带.结果如图 3 所示,在 700 bp 处出现一条特异性目的条带,初步表明外源肽 SD 的编码片段被成功插入到噬菌体的 pIII 基因中,重组噬菌体载体构建成功.

重组载体测序结果如图 4 所示,黄色标记部分为信号肽,红色标记部分为 SD 多肽序列,灰色标记部分为 Linker,绿色标记部分为 pIII 蛋白部分序列,目的片段的编码区(879~914)被成功连接到 fADL-1e 的 pIII 基因中,表明重组载体 fADL-1e-SD 构建成功,可用于下一步噬菌体 phage-SD 的制备.根据滴度计算公式,计算制备的噬菌体 phage-SD 滴度为 1.6×10^{11} pfu/mL.

2.2 Western-blot 分析噬菌体 phage-SD

为验证 p53 蛋白 N 端 SD 多肽与 pIII 融合表达并成功展示在噬菌体的表面,将制备的 phage-SD 分别与 anti-pIII 的单克隆抗体及 p53 抗体阳性肿瘤患者血清杂交,结果如图 5 所示,phage-SD 能同时与 anti-pIII 单克隆抗体及肿瘤患者血清 p53 抗体发生特异性反应,且目的条带位置相同,而该噬菌体与健康人血清无任何

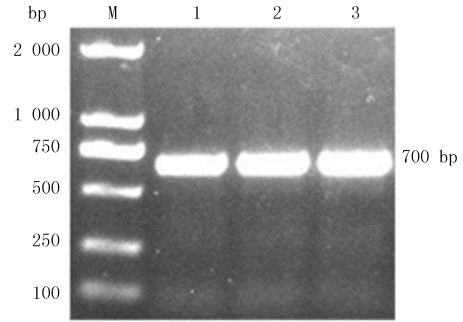
交叉反应,表明外源肽 SD 被成功展示在噬菌体的 pIII 蛋白表面,且能特异性的识别肿瘤患者血清 p53 抗体.



M:DNA marker;1:fADL-1e载体;2:Bgl I酶切后的fADL-1e载体.

图2 fADL-1e载体Bgl I酶切后电泳图

Fig.2 Electrophoretic profile of the vector fADL-1e digested by restriction enzyme Bgl I



M:DNA marker;1~3:阳性克隆.

图3 PCR验证重组fADL-1e载体阳性克隆

Fig.3 PCR analysis of the positive recombinant vector fADL-1e

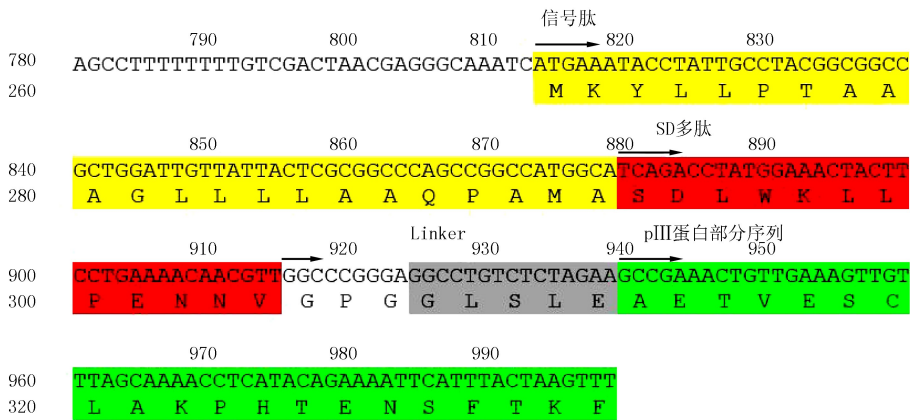
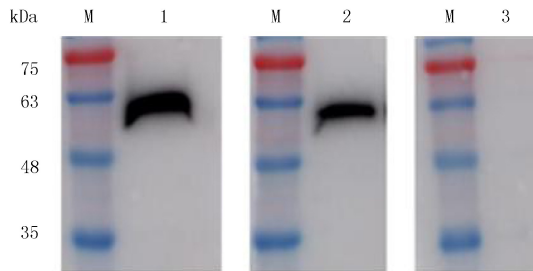


图4 重组噬菌体载体部分测序结果,其中第879~914为编码SD多肽的核苷酸序列

Fig.4 The sequence results of the recombinant vector, and the position of the SD polypeptide nucleotide sequence is from 879 to 914

2.3 噬菌体 phage-SD 检测血清 p53 抗体结果

分别以噬菌体 phage-SD, 重组 p53 蛋白为检测抗原, 利用 ELISA 方法对 60 例乳腺癌患者及 200 例健康人进行血清 p53 抗体的检测, 统计结果如表 1 和图 6 所示, 60 例乳腺癌患者中, 噬菌体 phage-SD 检测到 13 例 p53 抗体阳性患者血清, 检出率为 21.67%, 与重组 p53 蛋白检测效率 (21.67%) 一致, 两种检测方法的特异性分别为 96.50% (phage-SD-ELISA)、96.00% (p53-ELISA). 该结果表明, phage-SD 在检测乳腺癌患者血清 p53 抗体方面, 具有特异性强、灵敏度高且制备简单等优点, 可用于乳腺癌患者血清 p53 抗体的检测应用研究.



M:蛋白marker;1:phage-SD与anti-pIII蛋白的单克隆抗体杂交(阳性对照);2~3:phage-SD分别与p53抗体阳性肿瘤患者及健康人血清杂交(阴性对照).

图5 Western blot分析噬菌体phage-SD

Fig.5 Western blot analysis of phage-SD

表 1 两种 ELISA 方法检测两组血清抗 p53 抗体检出率

Tab. 1 The detection rates of serum p53 antibody in two groups using two ELISA methods

分组	人数	血清中抗 p53 抗体阳性的人群			
		phage-SD-ELISA		p53-ELISA	
		比例/%	<i>P</i> *	比例/%	<i>P</i> *
健康人	200	3.5	0.000	4.00	0.000
乳腺癌患者	60	21.67		21.67	

* 检验方法为 χ^2 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

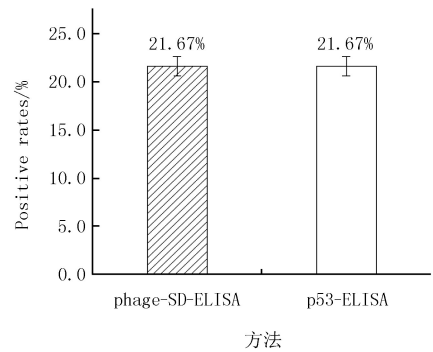


图6 噬菌体phage-SD检测乳腺癌患者血清p53抗体结果

Fig. 6 Detection of serum p53 antibody in breast cancer patients by phage-SD

3 讨论

从 CRAWFORD 等^[13]在乳腺癌患者血清中检测到 p53 抗体以来,大量研究证实,血清 p53 抗体在肿瘤的诊断、预后分析、疗效评估、复发及肿瘤早期发现等方面具有重要的参考价值^[14-15].LUBIN 等^[16]通过体外合成重叠多肽的方法系统研究了肿瘤患者血清 p53 抗体识别位点,发现血清 p53 抗体识别的表位主要位于蛋白的两端,其中绝大部分位于蛋白的 N 端,且该免疫应答反应与肿瘤类型无关.本文中选择的 SD 多肽即位于 p53 蛋白的 N 端第 20~31 位,是 p53 抗体识别的一个核心关键表位.噬菌体展示技术能够将基因型与表现型联系起来,使研究者可以在基因水平上实现对蛋白质构象的体外控制,在体外获得具有良好生物学活性的表达产物.在本研究中外源肽 SD 定向克隆到 pIII 外壳蛋白的 N 端的最前端,这样可使外源肽 SD 展示在噬菌体的表面并彻底暴露出来,便于抗体的识别,避免了该外源肽在蛋白内暴露不充分的问题.

目前,血清 p53 抗体的检测主要是以重组 p53 蛋白为检测抗原^[17-20],而重组蛋白的制备步骤烦琐、制备周期长且后期纯化成本较高、稳定性差.丝状噬菌体作为天然生物纳米材料在强酸和强碱的环境中能保持生物活性,具有稳定性高的特性,同时,噬菌体长期保存后仍具有感染活性,感染大肠杆菌后可大量制备噬菌体,生产成本低廉且后期纯化步骤简单.在本研究中,噬菌体 phage-SD 在乳腺癌患者血清 p53 抗体阳性检出率方面与重组 p53 蛋白一致,均为 21.67%,但是噬菌体 phage-SD 检测血清 p53 抗体的特异性(96.5%)稍高于重组 p53 蛋白(95%).这表明噬菌体 phage-SD 在检测乳腺癌患者血清 p53 抗体方面具有特异性强、灵敏度高优点,可以代替重组蛋白用于乳腺癌血清 p53 抗体的检测研究.

本研究以丝状噬菌体为模板,利用噬菌体展示技术将 p53 蛋白核心表位 SD 展示在噬菌体的 pIII 蛋白表面,成功制备一种灵敏度高、特异性强的可用于血清 p53 抗体检测的噬菌体 phage-SD,为新型血清 p53 抗体更有效和更低成本的检测试剂开发及临床应用奠定基础.

参 考 文 献

- [1] SMITH G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. *Science*, 1985, 228(4705): 1315-1317.
- [2] DENG X Y, WANG L, YOU X L, et al. Advances in the T7 phage display system (Review)[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 17(1): 714-720.
- [3] BAO Q, LI X, HAN G R, et al. Phage-based vaccines[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2019, 145: 40-56.
- [4] YANG M Y, SUNDERLAND K, MAO C B. Virus-derived peptides for clinical applications[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(15): 10377-10402.
- [5] DUNNE M, LOESSNER M J. Modified bacteriophage tail fiber proteins for labeling, immobilization, capture, and detection of Bacteria[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1918: 67-86.
- [6] PAN P T, WANG Y C, ZHU Y, et al. Nontoxic virus nanofibers improve the detection sensitivity for the anti-p53 antibody, a biomarker in cancer patients[J]. *Nano Research*, 2015, 8(11): 3562-3570.
- [7] SMITH G P, PETRENKO V A. Phage display[J]. *Chemical Reviews*, 1997, 97(2): 391-410.
- [8] MOON J S, CHOI E J, JEONG N N, et al. Research Progress of M13 Bacteriophage-Based Biosensors[J]. *Nanomaterials*, 2019, 9(10):

1448.

- [9] ZAENKER P, GRAY E S, ZIMAN M R. Autoantibody production in cancer—the humoral immune response toward autologous antigens in cancer patients[J]. *Autoimmunity Reviews*, 2016, 15(5): 477-483.
- [10] USHIGOME M, NABEYA Y, SODA H, et al. Multi-panel assay of serum autoantibodies in colorectal cancer[J]. *Int J Clin Oncol*, 2018, 23(5): 917-923.
- [11] KATCHMAN B A, CHOWELL D, WALLSTROM G, et al. Autoantibody biomarkers for the detection of serous ovarian cancer[J]. *Gynecologic Oncology*, 2017, 146(1): 129-136.
- [12] 刘珊珊, 吴陈华, 刘宇, 等. 牛外周血淋巴细胞 PD-1 胞外区基因的原核表达及多抗制备[J]. *中国生物制品学杂志*, 2021, 34(1): 32-37.
LIU S S, WU C H, LIU Y, et al. Prokaryotic expression of PD-1 extracellular domain gene of bovine peripheral blood lymphocytes and preparation of polyclonal antibody[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2021, 34(1): 32-37.
- [13] CRAWFORD L V, PIM D C, BULBROOK R D. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer[J]. *International Journal of Cancer*, 1982, 30(4): 403-408.
- [14] SABAPATHY K, LANE D P. Understanding p53 functions through p53 antibodies[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2019, 11(4): 317-329.
- [15] TERAS L R, GAPSTUR S M, MALINIAK M L, et al. Prediagnostic antibodies to serum p53 and subsequent colorectal cancer[J]. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2018, 27(2): 219-223.
- [16] LUBIN R, SCHLICHTHOLZ B, BENGOUFA D, et al. Analysis of p53 antibodies in patients with various cancers define B-cell epitopes of human p53; distribution on primary structure and exposure on protein surface[J]. *Cancer Research*, 1993, 53(24): 5872-5876.
- [17] TOMINAGA T, NONAKA T, MIYAZAKI T, et al. Clinical Significance of Serum p53 Antibody in the Early Detection and Poor Prognosis of Gastric Cancer[J]. *Anticancer Research*, 2017, 37(4): 1979-1984.
- [18] TORITANI K, KIMURA H, KUNISAKI R, et al. Uselessness of serum p53 antibody for detecting colitis-associated cancer in the era of immunosuppressive therapy[J]. *In Vivo*, 2020, 34(2): 723-728.
- [19] WEI Y P, ZHANG Y W, CHEN J S, et al. An electrochemiluminescence biosensor for p53 antibody based on Zn-MOF/GO nanocomposite and Ag⁺-DNA amplification[J]. *Microchimica Acta*, 2020, 187(8): 1-9.
- [20] SOBHANI N, D'ANGELO A, WANG X, et al. Mutant p53 as an antigen in cancer immunotherapy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(11): 4087.

Preparation and application of bacteriophage phage-SD displaying epitope of p53 protein

Liu Xingyou^{1,2}, Sun Mengyue¹, Pan Pengtao², Liu Guowei³

(1. College of life sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; 2. College of Life Science and Basic Medicine, Xinxiang University, Xinxiang 453003, China; 3. Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 453099, China)

Abstract: [Objective] This research aimed to prepare a new type of phage using phage display technology for the detection of serum p53 antibodies. [Methods] The fADL-le phage vector was double digested by *Bgl* I and then the adaptor molecule encoding the peptide SD located in the N-terminal of 20—31 amino acid of p53 protein was inserted in the gene III, and phage-SD was prepared and analyzed by Western blot. Then, serum p53 antibody in the breast cancer patients was detected by ELISA method using phage-SD and recombinant p53 protein as the coating antigen, respectively. [Results] The peptide SD was successfully displayed on the surface of the bacteriophage and the expressed peptide SD also could identify the p53 antibody. Among the 60 breast cancer patients, 17 patients(21.67%) were tested positive for serum p53 antibody by phage-SD ELISA, and the detection efficiency of this method was the same as the p53-ELISA. [Conclusion] Phage-SD was successfully prepared, and this phage presented high detection efficiency and specificity and had the potential to develop into a new type of diagnosis reagent for the detection of serum p53 antibody.

Keywords: phage display; filamentous bacteriophage; p53 antibody; ELISA