

噬菌体在血液中的失活及其机理的初步研究

马晓丽, 吴庆庆, 温龙平

(中国科学技术大学生命科学学院, 中国科学技术大学纳米生物学实验室, 安徽合肥 230027)

摘要: 为了研究噬菌体在体内的失活现象, 探讨血液中影响噬菌体活性的因素及其作用机理, 为噬菌体在体内作为治疗或诊断的可能应用以及动物体内噬菌体展示技术的进一步完善提供理论基础, 检测了 M13 噬菌体在血清和全血中的残余活性时间梯度, 进行了体内实验, 然后比较了几种情况下噬菌体在血液中的失活现象 (KSCN 洗脱与否、体温或补体失活的高温、注射免疫抑制剂与否、免疫缺陷型小鼠), 并初步探讨了噬菌体失活问题的解决办法。结果表明, 血清造成噬菌体快速失活, KSCN 及环磷酰胺处理可部分逆转该效应, 60 °C 处理基本上完全消除该失活现象。T 细胞缺陷型裸鼠和普通小鼠的失活效应相似。胰蛋白胍和牛血清白蛋白可部分解除血清对噬菌体的失活作用。我们认为, 血清中存在的因子是导致噬菌体失活的主要因素, 且很可能是由 IgM 介导的补体引发。

关键词: 噬菌体; 失活; 免疫球蛋白 M; 补体; 抗原抗体反应

中图分类号: Q939.48

文献标识码: A

Basic study on inactivation of phage in serum and its mechanism

MA Xiao-li, WU Qing-qing, WEN Long-ping

(Nano-biology laboratory, School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

Abstract: To investigate factors affecting the viability of phage in the blood and provide a basis for improving in vivo phage display applications, the percentages of active phage in serum and blood at various time points were measured, phage viabilities after various treatment conditions (washed by KSCN, high temperature which can inactivate complement, injection of immune suppressor, and use of nude mice) were compared, and some preliminary solutions to overcome this problem were put forward. The results show that serum can cause rapid inactivation of phage. KSCN and cyclophosphamide can partially, while 60 °C treatment can almost completely, inhibit this inactivation effect. The inactivation profile in nude mice is comparable to that in normal mice. Tryptone and BSA can partially overcome the inactivation factor in the serum. It was concluded that a heat-labile serum factor, most likely a type of complement-mediated IgM reaction, is responsible for inactivating phage in the blood.

Key words: phage; inactivation; IgM; complement; antigen-antibody reaction

收稿日期: 2007-04-23; 修回日期: 2007-09-27

基金项目: 中国科学院“百人计划”基金(KJ0887000001)资助。

作者简介: 马晓丽, 女, 1981年生, 硕士。研究方向: 纳米生物学。E-mail: sailorxl@mail.ustc.edu.cn

通讯作者: 温龙平, 教授。E-mail: lpwen@ustc.edu.cn

0 引言

近年来,关于蛋白-蛋白相互作用的研究已成为现代生物化学中的一个重要领域.噬菌体展示技术(phage display)是一种强大的研究蛋白-蛋白相互作用的生物技术^[1].它将外源肽或蛋白质与特定噬菌体衣壳蛋白融合并展示于噬菌体表面,从而筛选到人们所需的目的片段^[2~4].噬菌体展示技术体内筛选是直接将噬菌体肽库注射到动物体内,筛选与活体内某些器官或组织有特异结合活性的小肽^[5].噬菌体展示技术的体内筛选作为一种新兴手段,在血管靶向肽的筛选,肿瘤组织靶向肽的筛选,免疫反应的研究和相关疾病治疗、监测方面都有广泛的应用前景^[6~11].我们实验室将噬菌体展示技术应用到给药途径的研究中,并已成功筛选出可辅助蛋白类药物透皮的肽段^[12].然而在筛选过程中我们观察到了噬菌体在血液中的失活现象,它影响了体内筛选试验的进展,因此我们设计了一系列的体内体外实验观察并探讨其机理,以期寻找到解决的方法,并为体内噬菌体展示技术的进一步完善提供理论基础.

1 材料和方法

1.1 动物

昆明小鼠, balb/c 小鼠, 5~6 周龄, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司.

1.2 主要试剂

PHD7 phage lib, Bacto-Tryptone, yeast extract, NaCl, β -半乳糖苷(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, Xgal), 异丙基-B-D-硫代半乳糖苷(Isopropyl B-D-thiogalactopyranoside, IPTG), 硫氰酸钾(Potassium Thiocyanate, KSCN), 环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司).

1.3 LB/IPTG/Xgal 平板制作方法

10 g/L Bacto-Tryptone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl, 15 g/L 琼脂粉. 高压灭菌, 冷却至低于 70 °C 时, 加入 1 mL/L IPTG/Xgal, 混匀倒平板.

1.4 噬菌体滴度的测定

将样品加入 45 °C 预温的上层琼脂(10 g/L Bacto-Tryptone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl, 1 g/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 7 g/L 琼脂粉)培养管中, 快速混匀, 立即倾注于 37 °C 预温的 LB/IPTG/Xgal 平板上. 适当倾斜平板将上层琼脂均匀铺开. 待平板

冷却 5 min 后, 倒置于 37 °C 培养过夜. 检查平板, 计平板上的噬菌斑数.

1.5 体内失活实验

5~6 周昆明小鼠尾静脉注射 PHD7 噬菌体文库 50 μ L(滴度: 1.2×10^9). 15, 30, 60, 180, 300 min 后断尾取血, 分别取 200, 2, 0.02 μ L 血清检测滴度.

1.6 体外失活实验

取 1 mL 小鼠新鲜血液加入 0.5 μ L PHD7 噬菌体文库(滴度: 1.2×10^9), 混合均匀后取 500 μ L 血液离心得上清, 上清与血液分别于 37 °C 孵育, 在所需时间点将样品取出迅速倒板测滴度.

1.7 免疫抑制实验

5~6 周昆明小鼠尾静脉环磷酰胺(30 mg/kg), 对照组注射生理盐水, 24 h 后尾静脉注射 PHD7 噬菌体文库 50 μ L(滴度: 1.2×10^9). 15, 30, 60, 180, 300 min 后断尾取血, 分别取 200, 2, 0.02 μ L 血清检测滴度.

1.8 KSCN 洗脱实验

取 1 mL 小鼠新鲜血液加入 0.5 μ L PHD7 噬菌体文库(滴度: 1.2×10^9), 再加入 0.485 g KSCN(终浓度为 5 mol/L), 于 37 °C 孵育 5, 15, 30, 60 min 后涡旋振荡, 迅速倒板测滴度. 对照不加 KSCN.

1.9 补体灭活实验

取 1 mL 小鼠新鲜血液加入 0.5 μ L PHD7 噬菌体文库(滴度: 1.2×10^9), 分别于 37 °C 和 60 °C 孵育, 在所需时间点将样品取出迅速倒板测滴度.

1.10 无胸腺小鼠体内实验

5~6 周 balb/c 鼠尾静脉注射 PHD7 噬菌体文库 50 μ L(滴度: 1.2×10^9). 15, 30, 60, 180, 300 min 后断尾取血, 分别取 200, 2, 0.02 μ L 血清检测滴度.

1.11 添加剂实验

取 1 mL 小鼠新鲜血液分别加入 BSA 和 tryptone, 漩涡振荡均匀后再加入 0.5 μ L PHD7 噬菌体文库(滴度: 1.2×10^9), 在所需时间点将样品取出迅速倒板测滴度.

2 结果

2.1 体内失活

将噬菌体注射到小鼠体内后, 血液中活性噬菌体(能感染大肠杆菌产生噬菌斑)的数量随时间骤减, 5 min 后剩余 $(51.83 \pm 4.49)\%$ ($46.1\% \sim 56.7\%$), 而 15 min 时已减少至 $(19.78 \pm 1.61)\%$ ($17.9\% \sim 21.6\%$), 30 min 和 60 min 时只有 $(3.16 \pm$

0.33%)(2.7%~3.5%), (0.70±0.14%)(0.5%~0.9%)(图 1).

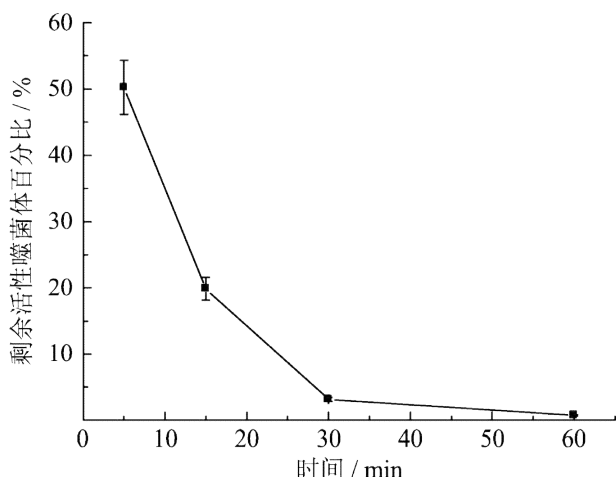


图 1 体内噬菌体动力学曲线

Fig. 1 The dynamic course of phage in vivo

2.2 体外失活

上述体内实验提示血液中可能存在能导致噬菌体失活的因子. 为验证这一点, 我们测试了全血、血清以及加入部分血细胞沉淀的血清对噬菌体活性的影响. 噬菌体和血清孵育 5, 15, 30, 60 min 后, 剩余活性为(45.18±3.45%)(41.4%~49.1%), (14.33±1.43%)(12.9%~16.7%), (4.10±0.63%)(3.2%~4.8%), (0.90±0.11%)(0.8%~1.0%); 相应的, 在全血中为(76.43±3.93%)(71.1%~81.2%), (21.60±2.24%)(18.9%~24.8%), (8.57±0.98%)(7.1%~9.8%), (4.68±0.54%)(3.9%~5.3%); 在加入部分血细胞沉淀的血清中为(58.72±2.78%)(55.2%~62.8%), (19.62±2.00%)(17.5%~22.5%), (6.67±0.72%)(5.9%~7.8%), (2.03±0.18%)(1.8%~2.3%)(图 2). 据

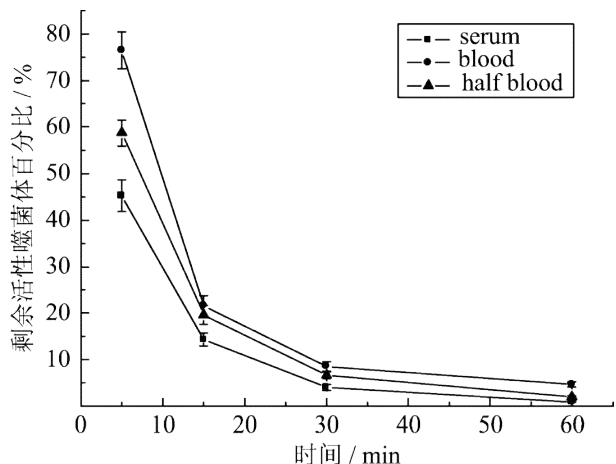


图 2 体外噬菌体动力学曲线(血清和全血的对比)

Fig. 2 The dynamic course of phage in vitro (serum and blood)

此可见噬菌体的失活是由血清中的物质引起的, 而由于位阻竞争作用, 血细胞的存在反而在一定程度上减轻了血清的失活作用. 血清对噬菌体的失活作用我们推测有两种可能的原因: 血清导致噬菌体结构变化(如蛋白酶的作用); 或是血清中某种组分在不导致噬菌体结构变化的条件下抑制噬菌体的活性(如结合于噬菌体而影响噬菌体感染大肠杆菌).

2.3 免疫抑制实验

为进一步探讨免疫系统在噬菌体失活作用中的作用, 我们进行了环磷酰胺(一种免疫抑制剂)实验. 小鼠用环磷酰胺预处理 24 小时后血液对噬菌体的失活作用明显减弱, 5, 15, 30, 60 min 时的活性噬菌体百分比分别为 (79.23±3.86%)(74.8%~85.1%), (30.82±3.32%)(26.5%~35.2%), (9.35±1.10%)(7.8%~10.8%), (2.37±0.52%)(1.8%~3.1%); 对照组的则为(51.48±4.39%)(45.3%~56.8%), (19.70±2.33%)(17.1%~23.2%), (3.17±0.37%)(2.7%~3.6%)和(0.80±0.18%)(0.6%~1.1%)(图 3).

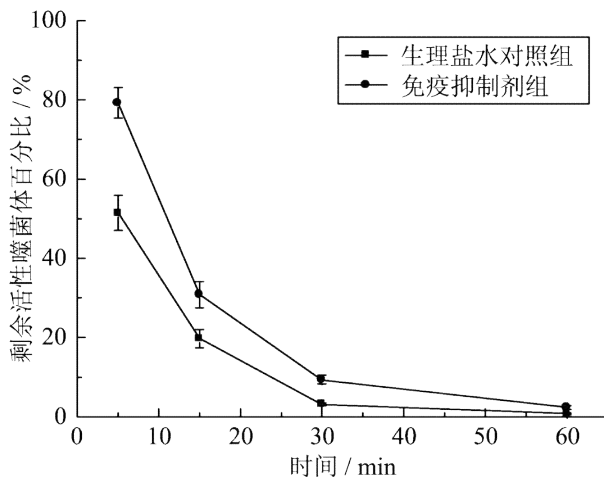


图 3 体内免疫抑制实验

Fig. 3 The immunity-restrain experiment in vivo

2.4 KSCN 洗脱

为测试血清中导致噬菌体失活的因素是否由抗体介导, 我们进行了抗原抗体洗脱剂 KSCN 实验. 采用 5 mol/L KSCN 洗脱 5, 15, 30, 60 min 时, 噬菌体活性分别为(76.05±5.60%)(68.3%~82.4%), (20.67±2.21%)(18.3%~23.8%), (5.40±0.63%)(4.6%~6.2%), (2.15±0.37%)(1.6%~2.5%)(图 4), 与不加 KSCN 的对照相比噬菌体失活程度有一定减少(特别是 5 及 15 min 时间点).

2.5 高温补体失活实验

噬菌体有可能由于引发了抗原抗体反应介导的

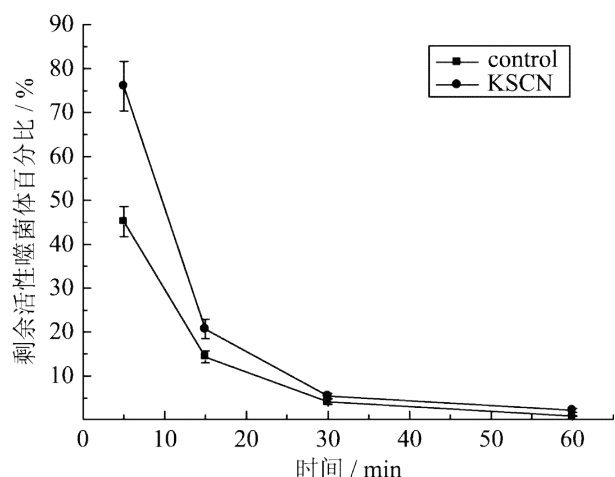


图 4 KSCN 洗脱前后的噬菌体活性变化

Fig. 4 The activity of phage before and after KSCN washing

补体反应而失活. 为测试这一假说, 我们对比了置于 60 °C 孵育过的血清 (56 °C 左右补体失活) 与 37 °C 处理过的血清 (不导致补体失活) 对噬菌体的失活作用. 噬菌体和 60 °C 处理过的血清孵育 5, 15, 30, 60 min 时, 噬菌体活性为 (89.80 ± 4.41)% (84.2% ~ 94.8%), (81.03 ± 4.08)% (74.1% ~ 85.6%), (75.30 ± 4.61)% (71.3% ~ 81.6%), (73.61 ± 3.11)% (68.4% ~ 77.4%) (图 5).

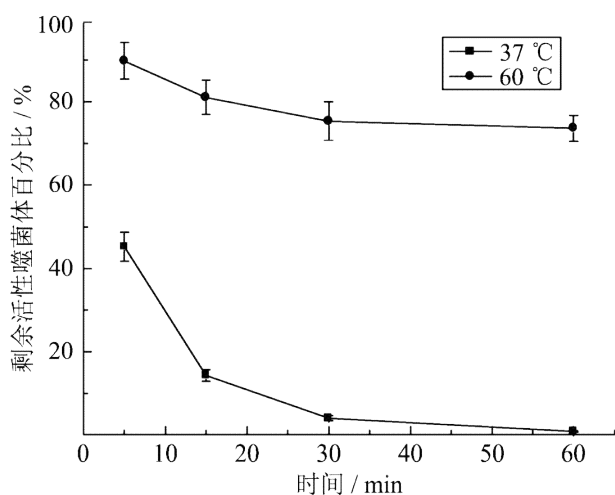


图 5 高温补体失活反应

Fig. 5 The inactivity of alexin in high temperature

2.6 免疫缺陷型小鼠体内失活实验

裸鼠 (T 细胞缺陷) 尾静脉注射噬菌体文库后, 活性噬菌体的数量变化和 普通小鼠类似, 5 min 后为 (55.47 ± 4.26)% (51.6% ~ 61.8%), 15 min 时减少至 (20.48 ± 2.33)% (17.8% ~ 23.6%), 30 min 和 60 min 时则为 (3.40 ± 0.38)% (3.0% ~ 3.8%), (0.85 ± 0.21)% (0.6% ~ 1.1%) (图 6). 这个实验显示 T 细胞并不参与噬菌体的失活, 这与前面抗原

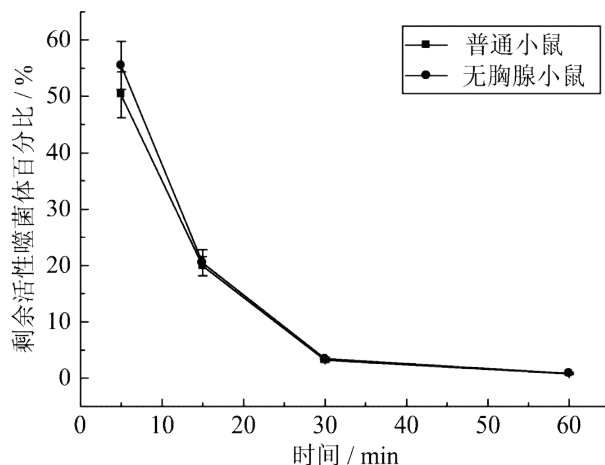


图 6 无胸腺小鼠体内实验

Fig. 6 The experiment in nude mouse

抗体、补体以及环磷酰胺实验结果相对应.

2.7 添加剂实验

我们在测试了多种物质的基础上发现胰蛋白胍 (tryptone) 和牛血清白蛋白 (BSA) 可部分解除血清对噬菌体的失活作用. 加入胰蛋白胍后在 5, 15, 30, 60 min 时的活性噬菌体百分比分别为 (60.57 ± 4.75)% (54.7% ~ 66.7%), (23.48 ± 2.63)% (20.3% ~ 26.6%), (12.62 ± 1.37)% (10.9% ~ 14.8%), (3.28 ± 1.22)% (2.2% ~ 4.8%); 加入 BSA 后相应数据则为 (65.95 ± 5.53)% (59.8% ~ 72.4%), (28.15 ± 2.23)% (25.4% ~ 31.0%), (10.40 ± 1.16)% (8.8% ~ 11.8%), (1.97 ± 0.45)% (1.4% ~ 2.6%) (图 7). 与对照相比均有明显增加.

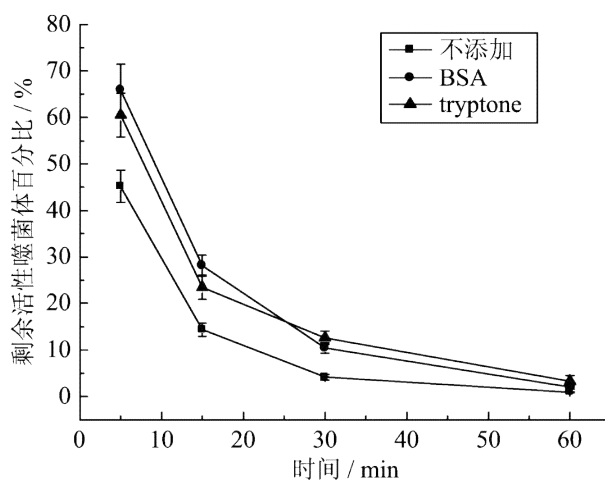


图 7 添加剂实验

Fig. 7 The experiment of extra substance

3 讨论

噬菌体展示技术应用到动物体内已筛选出许多具有各种生物学功能的短肽及蛋白, 噬菌体并有望

直接在体内作为治疗或诊断应用. 然而噬菌体在血液中很容易失活, 解决该问题对拓展噬菌体的生物医学应用具有重要意义.

本研究显示噬菌体进入小鼠体内 5 min 后即有大约 50% 的噬菌体失活, 60 min 后只剩下 1% 有活力的噬菌体. 血清中存在的因子是导致噬菌体失活的主要因素. 抗原抗体洗脱剂的应用提示血清中可能有抗体与噬菌体发生了抗原抗体反应并抑制了噬菌体的活性, 而 KSCN 处理可部分逆转该反应; 高温补体失活实验的结果显示 60 °C 处理有效破坏了血清中导致噬菌体失活的因子, 这与我们上面提出的补体假说是相吻合的, 不过应当指出, 该实验并不能排除血清失活因子是热敏感型的非补体因子; 免疫抑制剂实验提示免疫系统特别是 B 细胞系统在噬菌体失活作用中扮演了重要角色; 免疫缺陷型小鼠体内失活实验提示 B 细胞介导的免疫反应是导致噬菌体失活的主要因素. 通过这一系列实验, 我们推测 B 细胞介导的抗体免疫反应是导致噬菌体失活的主要因素, 且很可能是由补体介导的. 由于 IgG 具有抗原特异性, 而 B 细胞不需要受外界刺激就能表达低亲和力的 IgM, 由此我们推测噬菌体失活反应有可能是由补体介导的 IgM 引发. 血清中加入胰蛋白胍或 BSA 可部分解除血清对噬菌体的失活作用, 从而回收更多有感染活性的噬菌体, 该发现对噬菌体展示技术的体内应用有一定的应用价值.

参考文献 (References)

- [1] Sidhu S S, Fairbrother W J, Deshayes K. Exploring Protein-Protein Interactions with Phage Display [J]. *Chem Bio Chem*, 2003, 4: 14-25.
- [2] Willats W G T. Phage display: practicalities and prospects [J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 50: 837-854.
- [3] Jia Li-yan, Zhang Ying. The Developing of Phage Display Technology [J]. *Swing Industry Science*, 2004, 21(6): 12-13.
- 贾丽艳, 张映. 噬菌体展示技术的研究进展 [J]. *动物科学与动物医学*, 2004, 21(6): 12-13.
- [4] Liu Jing, Huang Hua-liang, Jiang Shu-de, et al. Antibody Phage Display Technology: Realities Approaching to the Dream [J]. *Hereditas*, 2003, 24(1): 94-99.
- 刘晶, 黄华梁, 姜述德, 等. 噬菌体抗体库技术: 靠近理想的现实 [J]. *遗传*, 2003, 24(1): 94-99.
- [5] Wu Jie, Ma Wen-li, Zheng Wen-ling, et al. Research Progress of Screening in vivo of Phage Display [J]. *Chemistry of Life*, 2003, 23(2): 155-157.
- 武婕, 马文丽, 郑文岭, 等. 噬菌体展示技术体内筛选的研究进展 [J]. *生命的化学*, 2003, 23(2): 155-157.
- [6] Dennis M S, Eigenbrot C, Skelton N J, et al. Peptide exosite inhibitors of factor VIIa as anticoagulants [J]. *Nature*, 2000, 404(6777): 465-470.
- [7] Rajotte D, Arap W, Haqedorn M, et al. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display [J]. *J Clin Invest*, 1998, 105(2): 430-437.
- [8] Zurita A J, Arap W, Pasqualini R. Mapping tumor vascular diversity by screening phage display libraries [J]. *Journal of Controlled Release*, 2003, 91: 183-186.
- [9] Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model [J]. *Science*, 1998, 279(5349): 377-380.
- [10] Nilsson F, Tarli L, Viti F, et al. The use of phage display for the development of tumour targeting agents [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2000, 43: 165-196.
- [11] Peletskaya E N, Glinsky V V, Glinsky G V, et al. Characterization of peptides that bind the tumor-associated Thomsen-Friedenreich antigen selected from bacteriophage display libraries [J]. *J Mol Biol*, 1997, 270: 374-384.
- [12] Chen Yong-ping, Shen Yuan-yuan, Guo Xin, et al. Transdermal Protein Delivery by a coadministered peptide identified via phage display [J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(4): 455-460.