

# SPA 单结构域突变体组合噬菌体文库的构建及体外进化筛选

林子玉<sup>1</sup>, 丁莹莹<sup>2</sup>, 周 鹏<sup>1</sup>, 高彩霞<sup>2</sup>, 冯娇娇<sup>2</sup>, 王锦红<sup>2</sup>, 潘 卫<sup>2</sup>, 邓松华<sup>1,3</sup>

**摘要** 目的 使用人免疫球蛋白 G (IgG) 对金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 单结构域突变体组合文库进行体外分子进化筛选, 判断不同突变体组合的特异结合优势, 探索优势组合分子结构与功能间的关系。方法 通过 Overlap PCR 获得 SPA 中 A 和 C 单结构域突变体片段组合构成的噬菌体文库, 再使用人 IgG 对文库进行体外亲和筛选, 期望通过对特定结合分子的定向改造及体外进化获得具有高结合优势的组分子。结果 成功构建符合体外筛选要求的 SPA 单结构域 A 在 29、30 位氨基酸定点突变文库 (A<sub>1</sub>)、SPA 单结构域 C 在 36、37 位定点突变文库 (C<sub>1</sub>) 和 SPA 单结构域 A 在 37 位后插入 3 个氨基酸随机肽 (A<sub>137</sub>)、SPA 单结构域 C 在 20 位后插入 3 个随机连接肽 (C<sub>120</sub>)。将 A<sub>1</sub>、C<sub>1</sub> 随机组合构建的噬菌体展示文库命名为库 A<sub>1</sub>C<sub>1</sub>, 将 A<sub>137</sub>、C<sub>120</sub> 随机组合构建的噬菌体展示文库命名为库 A<sub>137</sub>C<sub>120</sub>。两个文库各自经过 4、5 轮亲和筛选, 文库进化完全。Phage-ELISA 高密度值的单克隆测序结果分析为 A<sub>(Q29K30)</sub>A<sub>(I29I30)</sub> 和 A<sub>1-TQS</sub>A。结论 通过定向改造技术获得了高结合能力的定点突变分子 A<sub>(Q29K30)</sub>A<sub>(I29I30)</sub> 和插入突变分子 A<sub>137-TQS</sub>A, 为 Ig 结合分子的定向改造及具有新的 Ig 结合特性的重组 Ig 结合分子的进一步研究奠定了基础。

**关键词** AC 突变体; 噬菌体展示文库; 筛选; 人免疫球蛋白 G

中图分类号 R 392.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)09-1262-06

自然界中许多细菌表达多种与宿主免疫球蛋白、血清白蛋白、纤维蛋白原等血清蛋白有结合活性的蛋白 [immunoglobulin (Ig)-binding proteins, IB-PS]<sup>[1]</sup>, 介导细菌致病性。其中, 典型代表有金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA)、链球菌蛋白 G 及大消化链

球菌蛋白 L<sup>[2-4]</sup>。是由多个同源序列首尾相连构成, Protein A 中分别命名为 E、D、A、B 和 C, 单个结构域由 3 个反向平行的螺旋组成, 单独即具有 Ig 结合活性<sup>[5]</sup>。该研究应用分子定向改造及体外分子进化平台获得了更高结合活性的非天然存在的新型免疫球蛋白结合分子 D-C<sup>[6]</sup>、A-C<sup>[7]</sup>、AL(VV)<sup>[8]</sup> 等。在此基础上, 该研究通过对 A-C 中单结构域进行定向改造随机组合构成的噬菌体文库, 应用人 IgG 分子进行体外进化筛选, 分别获得了具有特异结合优势的新型组分子 A<sub>(Q29K30)</sub>A<sub>(I29I30)</sub> 和 A<sub>137-TQS</sub>A。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒载体和菌株** 噬菌粒载体 pCANT-AB5S-SPA AC 质粒由第二军医大学病原生物教研室构建保存, 辅助噬菌体 M13K07; 大肠杆菌 Top10、*E. coli* TG1; 噬菌粒载体 pCANTAB5S 由第二军医大学病原生物教研室保存。

**1.1.2 主要试剂** 限制性内切酶 Xba I、碱性磷酸酶购自宝生物工程(上海)公司; DNA Taq 酶购自日本 TaKaRa 公司; 高效连接液购自日本 TOYOBO 公司; 氨苄青霉素与卡那霉素均购自上海华美生物公司; 质粒小提试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 人免疫球蛋白 G (intravenous gamma globulin, IgG) 由第二军医大学病原生物教研室制备。

### 1.2 方法

**1.2.1 引物设计** 根据本实验室保存的碱基序列设计 13 条引物, 见表 1。应用 13 条引物进行 Overlap PCR 构建 A-C 突变体单结构域 DNA 片段, 且片段两端引入 Xba I 酶切位点及 53 bp 保护碱基。PCR 扩增鉴定噬菌粒 pCANTAB5S 中克隆片段及测序上游引物为 PCANTAB5S-1 序列: 5'-CAACGT-GAAAAAATTATTATTCGCG-3', 下游引物 PCANTAB5S-6 序列: 5'-GTAAATGAATTTTCTGTTATGAGG-3'。以上引物均由上海生工生物工程科技服务有限公司合成。

**1.2.2 A-C 单结构域突变体组合文库的构建** 以 PCANTAB5S-SPA AC 质粒为模板, 以 UA1 和 DA1,

2015-04-29 接收

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (编号: SS2014AA021403); 国家自然科学基金 (编号: 30872405、30472050、30972632); 上海市科学技术委员会科研计划项目 (编号: 08JC1405200)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学病理生理学教研室, 合肥 230032

<sup>2</sup>第二军医大学病原生物学教研室, 上海 200433

<sup>3</sup>安庆医药高等专科学校, 安庆 246052

作者简介: 林子玉, 女, 硕士研究生;

潘 卫, 男, 博士生导师, 责任作者, E-mail: weipan@yahoo.com;

邓松华, 男, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: desoh@126.com

表1 A-C 单结构域突变体片段的扩增引物

名称	描述	序列(5'-3')
UA1	A1-1、A2-1	F: TCGTCAGACGCCGTACCTGCTCTAGAGCTGACA ACAATTTCAAC
DA1	A1-1	R: ATCTTTTAAAGCTTTGGATSNNSNNTTGGCTTGTTC TTCGTT
UA2	A1-2	F: ATCCAAAGCTTAAAAGATGACCCAAGTCAAAGT
DA2	A1-2、A2-2	R: TCGTCAGACGCCGTACCTGCTCTAGATTTCCGGTG CTTGAGATTTC
UC1	C1-1、C2-1	F: TCGTCAGACGCCGTACCTGCTCTAGAGCTGACA ACAAATTTCAAC
DC1	C1-1	R: TTCTTTGCTCACTGAAGGSNNSNNTTTAAGGCTTT GGATGAA
UC2	C1-2	F: CCTTCAGTGAAGAAAGAAATTTTAGCAGAAGCT
DC2	C1-2、C2-2	R: TCGTCAGACGCCGTACCTGCTCTAGATTTTGGTG CTTGAGCATC
Da1	A2-1	R: GTTAGCACTTTGACTTGGSNNSNNSNNGTCATCT TTTTAAGCTTTG
Ua2	A2-2	F: CCAAGTCAAAGTCTAACCTATTGTCAGAAGCT
De1	C2-1	R: TTGTCTTCAGTTAAGTTSNNSNNSNNAAGTAAATG TAAAATTTTC
Uc2	C2-2	F: AACTTAACTGAAGAACAACGTAACGGCTTCATC
Sec	二次延长	F: ATACCTAGCCATTACCCTAGCCACCTAGTCCGTCCG TCAGACGCCGTACCTGCTCTAGA R: ATACCTAGCCATTACCCTAGCCACCTAGTCCGTCCG TCAGACGCCGTACCTGCTCTAGA

黑体“TCTAGA”为 Xba I 酶切位点,各条引物中酶切位点前面的序列为保护碱基,NNS 为随机突变位点碱基序列(N = A/T/G/C, S = G/C)

UC1 和 DC1,UA1 和 Da1,UC1 和 De1 为上下游引物 PCR 扩增 A1-1、C1-1、A<sub>137</sub>-1、C<sub>120</sub>-1,以 UA2 和 DA2,UC2 和 DC2,Ua2 和 DA2,Uc2 和 DC2 PCR 扩增 A1-2、C1-2、A<sub>137</sub>-2、C<sub>120</sub>-2,再用 overlap PCR 技术,以 UA1 和 DA2,UC1 和 DC2 为上下游引物合成完整的在不同位点定向改造的突变体 A1、C1、A<sub>137</sub>、C<sub>120</sub> 片段。同时为提高酶切效率在上下游引入保护碱基 Sec,以上面 4 个突变体单结构域片段为模板,PCR 扩增到最终含 53 bp 保护碱基的 4 个单结构域片段。将 4 个片段 PCR 产物纯化后经 Xba I 酶切,与同时酶切并 CIAP 酶去磷酸化处理的 PCANTAB5S 连接后转化 TG1 超级感受态细胞<sup>[9]</sup>。取 1 μl 菌液稀释后涂 2 × YT 平板(Amp),计算库容。挑 22 个单克隆 PCR 鉴定,选含 2 个 domain 阳性单克隆菌种,委托杰李基因科技股份有限公司序列测定,分析文库突变点序列随机性。剩余菌液扩大培养到 7 ml 2 × YT 培养基(Amp)中,37 °C 225 r/min 培养到对数期;加 800 μl 滴度 1.3 × 10<sup>12</sup> TU/L M13K07 辅助噬菌体,37 °C 225 r/min 离心 1 h;加 9 μl Kana,37 °C 225 r/min 振荡培养过夜。过夜菌液经 11 000 r/min 离心 10 min,上清液经 0.22 μm 滤膜过滤,滤液即原

代噬菌体文库。测定滴度<sup>[10]</sup>。

1.2.3 人 IgG 对 SPA AC 突变体组合噬菌体文库的体外分子进化筛选 应用人 IgG 对上述构建的噬菌体文库进行 4、5 轮体外分子进化筛选,具体步骤参见相关文献<sup>[11]</sup>。筛选中空噬菌体数的减少和多结构域的增加是筛选进度的监测指标。在构建文库中发现 5S 自连即零插入噬菌体占很少比例,所以将原代文库与 5S 等比例混合构成筛选起始文库。

1.2.4 对筛选后文库中随机突变体单克隆噬菌体的 phage ELISA 检测 将两个筛选后的库质粒分别转化 TG1 感受态,涂 2 × YT 平板(Amp),37 °C 过夜培养。从两个文库转化的平板上各随机挑取 90 个单克隆,分别接种于 1.5 EP 管中,于 1 ml 2 × YT (Amp) 中培养至对数期,经辅助噬菌体 M13K07 拯救,制备成不同单克隆来源的单克隆噬菌体。相同方法制备 3 个野生型 AC 单克隆噬菌体和 3 个 PCANTAB5S 空噬菌体。将制备好的不同来源的单克隆噬菌体 100 μl 加入用人 IgG 包板的 ELISA 排条中,37 °C 2 h 后用 PBST 洗 5 次,加入抗噬菌体酶联单抗结合,37 °C 2 h 后用 PBST 洗 5 次,TMB 显色后 450 nm 读取光密度(optical density, OD) 数值,检测各单克隆噬菌体与人 IgG 的结合活性。挑取高 OD 值的单克隆噬菌体送测序。

1.2.5 ELISA 法验证优势突变组合分子噬菌体结合活性 将优势突变组合分子 A<sub>(Q29K30)</sub> A<sub>(I29I30)</sub> 和 A<sub>137-4QS</sub>A 的单克隆划 LB(Amp),37 °C 培养过夜。为确保结果真实可靠,随机挑取 7 个菌落分别接种于 7 管 2 × YT 培养基(Amp)中,经 M13K07 拯救,制备 7 管具有相同展示物却来自不同单克隆的噬菌体,测滴度后作平行组实验。同样制备 PCANT-AB5S-AC 噬菌体和 PCANTAB5S 噬菌体,作阳性和阴性对照。取 100 μl 噬菌体加入人 IgG 包板的 ELISA 板条中,37 °C 2 h 用 PBST 洗 5 次,加入抗噬菌体酶联单抗结合,37 °C 2 h 后 PBST 洗 5 次,TMB 显色后读取 OD<sub>450</sub> 值,检测单克隆噬菌体与人 IgG 结合活性。

1.3 统计学处理 采用 SAS 9.1 统计软件对 ELISA 检测数据进行统计学处理,计量资料两组间比较采用非参数检验。

## 2 结果

2.1 各单结构域突变体片段的构建 经 PCR 扩增得到 A1-1、A1-2、C1-1、C1-2、A<sub>137</sub>-1、A<sub>137</sub>-2、C<sub>120</sub>-1、C<sub>120</sub>-2,再用 Overlap PCR 技术合成完整的在不同位点突变

的 A1、C1、A<sub>137</sub>、C<sub>120</sub> 片段; 最后, 为延长保护碱基提高酶切效率, 再次 PCR 扩增得到两端分别引入 53 bp 保护碱基的 A1、C1、A<sub>137</sub>、C<sub>120</sub> 突变体片段见图 1。

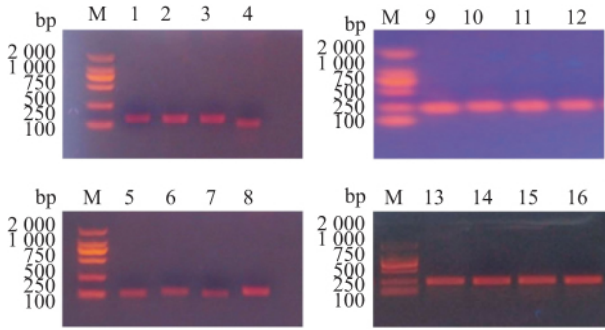


图1 SPA AC 单结构域突变体片段的构建

M: Marker; 1、2、3、4: A1-C1、A<sub>137</sub>-C<sub>120</sub>、A1-2、C1-2; 5、6、7、8: A1-2、C1-2、A<sub>137</sub>-2、C<sub>120</sub>-2; 9、10、11、12: 完整的突变体 A1、C1、A<sub>137</sub>、C<sub>120</sub>; 13、14、15、16: 加上 53 bp 保护碱基的突变体 A1、C1、A<sub>137</sub>、C<sub>120</sub>

**2.2 噬菌体文库的构建及插入情况鉴定** 将突变片段 A1、C1、A<sub>137</sub>、C<sub>120</sub> 经 Xba I 酶切与同样酶切并 CIAP 处理的噬菌粒 pCANTAB5S 连接, 连接产物转化超级感受态细胞 *E. coli* TG1, 文库的 A1C1 的库容和文库 A<sub>137</sub>C<sub>120</sub> 分别为  $3.0 \times 10^6$  和  $2.0 \times 10^6$ , 滴度依次为  $2.3 \times 10^{12}$  和  $2.1 \times 10^{12}$  (TU/ml)。在两文库原代中各挑 24 个转化子, 对原代文库结构域片段插入情况 PCR 结果表明, 文库 A1C1 结构域插入率为 90%, 文库 A<sub>137</sub>C<sub>120</sub> 结构域插入率为 79%。PCR 鉴定的 8 个插入多个结构域片段的阳性克隆序列测定结果表明: 在插入的噬菌粒上共 16 个单结构域中, A1:C1:A<sub>137</sub>:C<sub>120</sub> 个数比为 5:3:4:4, 具有随机性。在插入的 16 个单结构域片段中, 插入片段的正反比为 1:1, 总插入片段的正反向也具有随机性, 见表 2。所构建的文库符合体外进化筛选要求。

表2 SPA AC 突变体组合文库测序分析

序号	测序	突变位点情况
1	A1-C1	ACGTAC-GCGTAT
2	A1-A1	CAGAAG-ATCATC
3	C1 <sup>R</sup> -C1 <sup>R</sup>	ACGAAC-CAGTCT
4	A1 <sup>R</sup> -A1 <sup>R</sup>	TTGTAT-GGGATC
5	A <sub>137</sub> -C <sub>120</sub>	GAGGACGAC-AACGGCTGG
6	C <sub>120</sub> -C <sub>120</sub>	ATCAGCAGC-TCCTGCAAC
7	A <sub>137</sub> <sup>R</sup> -A <sub>137</sub> <sup>R</sup>	TCGATGTAG-TACAAGAGC
8	C <sub>120</sub> <sup>R</sup> -A <sub>137</sub> <sup>R</sup>	ACCTCGTGC-GACACGACT

R 代表逆向插入的片段

**2.3 人 IgG 对噬菌体展示文库筛选进化过程** 噬菌体文库中展示两个结构域噬菌体比例的增加和空

噬菌体的减少是监测筛选进度及结果的指标。由图 2 可知, 筛选进化中, 展示两个结构域片段克隆所占比例不断稳定增加, 零插入克隆和单个结构域片段克隆所占比例逐渐减少, 最后完全消失, 充分体现筛选的有效性。

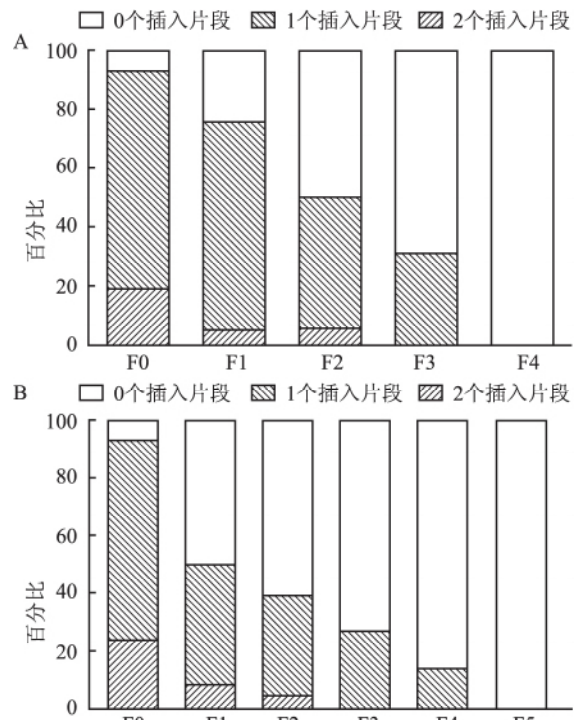


图2 人 IgG 对文库 A1C1 和文库 A<sub>137</sub>C<sub>120</sub> 中 23 个单克隆噬菌体插入片段的组成比例变化

A: A1C1; B: A<sub>137</sub>C<sub>120</sub>

**2.4 ELISA 法检测不同来源的单克隆噬菌体与人 IgG 的结合力** 将制备好的 96 孔不同来源的单克隆噬菌体加入人 IgG 包板的 ELISA 板条, 与 M13 二抗结合, TMB 显色读取 OD<sub>450</sub> 数值结果显示, 两个文库中都出现了与野生型 AC 结合力相当, 甚至高与其他单克隆噬菌体。两文库的 96 孔单克隆噬菌体 Phage ELISA 结果见图 3。

**2.5 ELISA 法检测优势突变分子与人 IgG 的结合力** 将 A<sub>(Q29K30)</sub> A<sub>(I29I30)</sub>、A<sub>137-TQS</sub> A、PCANTAB5S-AC 和 PCANTAB5S 共 4 组分别制备 7 个单克隆噬菌体, 并将滴度均调整为约  $1.0 \times 10^{12}$  TU/ml 后相同条件下进行 ELISA 法比较各组噬菌体分别对人 IgG 的结合活性。结果显示 A<sub>(Q29K30)</sub> A<sub>(I29I30)</sub> 噬菌体和 A<sub>137-TQS</sub> A 噬菌体结合能力都强于 PCANTAB5S-AC 噬菌体, A1 与 AC 比较差异无统计学意义 (Chi = 1.434, P = 0.838), A2 与 AC 比较差异有统计学意义 (Chi = 9.882, P = 0.042), 见图 4。

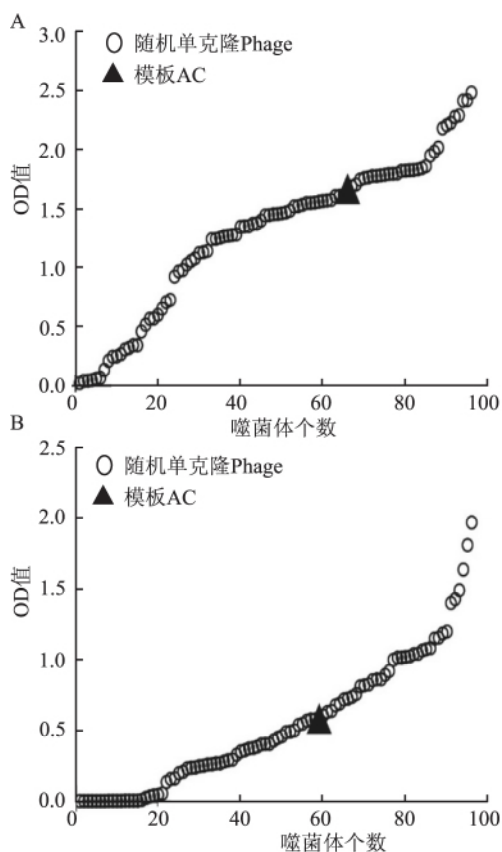


图3 对文库 A1C1 和文库 A<sub>137</sub>C<sub>120</sub> 各 96 个单克隆噬菌体 phage ELISA 结果  
A: A1C1; B: A<sub>137</sub>C<sub>120</sub>

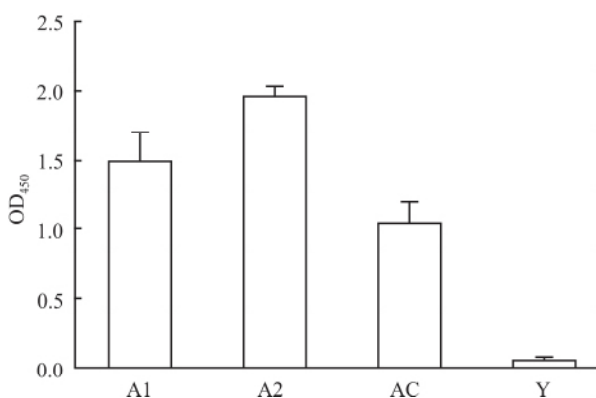


图4 ELISA 法比较 A<sub>(Q29K30)</sub> A<sub>(I29I30)</sub>、A<sub>137-TQS</sub>A 和 AC 噬菌体对人 IgG 结合活性

A1: A<sub>(Q29K30)</sub> A<sub>(I29I30)</sub>; A2: A<sub>137-TQS</sub>A; AC: 原始模板; Y: 阴性对照

**2.6 人 IgG 对文库 A1C1 和文库 A<sub>137</sub>C<sub>120</sub> 挑取高 OD 值结果测序** 文库 A1C1 经过 4 轮亲和筛选, 文库 A<sub>137</sub>C<sub>120</sub> 经过 5 轮亲和筛选, PCR 鉴定结果显示文库进化统一为 2 个 domain 的片段, 表明进化完全。分别在最后一代挑 96 个单克隆制备成单克隆噬菌体, 取 OD 值最高的单克隆噬菌体送测序, 测序结果分析文库 A1C1 最终进化完全为 A<sub>(Q29K30)</sub> A<sub>(I29I30)</sub>, 文库 A<sub>137</sub>C<sub>120</sub> 最终进化完全为 A<sub>137-TQS</sub>A。

### 3 讨论

噬菌体表面展示技术是于 1985 年首先建立起来的一种新的生物技术, 能将外源多肽展示于噬菌体表面, 并能保持相对独立的空间构象和原有生物活性<sup>[12]</sup>。本实验对 SPA(AC) 单结构域 A 在 29、30 位氨基酸定点突变建成文库(A1)、SPA 单结构域 C 在 36、37 位定点突变建成文库(C1) 和 SPA 单结构域 A 在 37 位后插入 3 个氨基酸随机肽建成文库(A<sub>137</sub>)、SPA 单结构域 C 在 20 位后插入 3 个随机连接肽建成文库(C<sub>120</sub>) 将 A1、C1 随机组合构建的噬菌体展示文库命名为库 A1C1, 将 A<sub>137</sub>、C<sub>120</sub> 随机组合构建的噬菌体展示文库命名为库 A<sub>137</sub>C<sub>120</sub>。两个文库的库容分别为  $3.0 \times 10^6$  和  $2.0 \times 10^6$ , 滴度依次为  $2.3 \times 10^{12}$  和  $2.1 \times 10^{12}$  (TU/ml)。文库的插入率分别为 90% 和 79%, 具有 2 个 Domain 片段测序结果表明文库的插入情况、正反向比例都具有随机性, 达到筛选要求。再应用人 IgG 分子进行体外进化筛选, 展示 2 个 Domain 片段逐渐富集, 展示 1 个 Domain 片段和空载体逐渐减少和消失, 筛选到第 4、5 代时, 文库全部进化为两个结构域组合分子, 表明文库进化完全, 体现筛选的有效性。在两文库的第 4、5 代各挑取 96 个单克隆制备成单克隆噬菌体, phage ELISA 获得高 OD 值的单克隆测序结果为 A<sub>(Q29K30)</sub> A<sub>(I29I30)</sub> 和 A<sub>137-TQS</sub>A。

SPA 是细菌表面与宿主抗体结合的蛋白, 各单结构域都可与哺乳动物 IgG 的 Fc 结合, 该结合一螺旋 1 和螺旋 2 与 Fc 的疏水作用为主, 并通过分子间的四对氢键得到进一步的稳定<sup>[13]</sup>, 是有价值的诊断、治疗和抗体制备工具。此文库对 SPA 各单结构域重组后的具有特异优势结合后免疫球蛋白结合蛋白分子 AC 进行分子突变重组定向改造, 以进一步探索结合特性。由图 5 所示\* 号所标记的氨基酸位点为与 IgG 结合位点<sup>[8]</sup>, 对 A<sub>(Q29K30)</sub> A<sub>(I29I30)</sub> 突变体的分析结果表明两个单结构域都是在 29、30 位 GF 突变体中得到, 说明在足够库容的情况下螺旋 2 中氨基酸的改变是可以影响其与 Fc 段的结合能力, 达到增加结合力的效果。对 A<sub>137-TQS</sub>A 突变体分析表明延长螺旋 2 和螺旋 3 之间的长度, 将 SPA A 与 Fc 段的结构构象进行优化调整, 从而提高了结合活性。在插入突变文库 A<sub>137</sub>C<sub>120</sub> 中所获得的高结合力免疫球蛋白结合分子 A<sub>137-TQS</sub>A 之所以会有野生型 A 的出现, 经过分析很可能是因为第一轮 PCR 构建文库片的过程中模板 AC 浓度过高, 以至于在 Overlap PCR 过程



中以残留原始模板 AC 优先合成野生型 A 结构域,参与了后面的酶切与连接 这个也是以后做此类实验中要注意的一点,以免影响文库构建的质量。

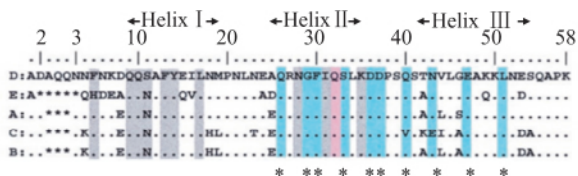


图5 免疫球蛋白结合分子结合位点示意图

在文库 A1C1 中选择在每个单结构域突变两个结合位点,主要考虑单个位点的突变可能对构象的影响不大,同时设置的突变位点相邻,可以很容易设计引物实现多位点的突变,且每个位点均是随机突变,可以产生尽可能多氨基酸组合,达到增加优势 AC 突变体的可能。在文库 A<sub>137</sub>C<sub>120</sub> 中选择螺旋 1 和螺旋 2 之间,螺旋 2 和螺旋 3 之间加入 3 个随机连接肽是因为在空间结构上这个位置与 IgG 的 Fc 结合位点位置离的最近,更容易对构象产生影响。

免疫球蛋白结合分子其独特抗体结合特性已被广泛用于抗体检测、抗体纯化、免疫沉淀研究和免疫吸附治疗。对免疫球蛋白的定向人工改造可提高其对抗体结合能力,提高应用价值,显示应用前景。

### 参考文献

[1] Housden N G, Harrison S, Roberts S E, et al. Immunoglobulin-binding domains: Protein L from *Peptostreptococcus magnus* [J]. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31( Pt 3): 716-8.

[2] Atkins K L, Burman J D, Chamberlain E S, et al. *S. aureus* IgG-binding proteins SpA and Sbi: host specificity and mechanisms of immune complex formation [J]. *Mol Immunol*, 2008, 45( 6): 1600-11.

[3] Goward C R, Scawen M D, Murphy J P, et al. Molecular evolu-

tion of bacterial cell-surface proteins [J]. *Trends Biochem Sci*, 1993, 18( 4): 136-40.

[4] Nomellini J F, Duncan G, Dorocicz I R, et al. S-layer-mediated display of the immunoglobulin G-binding domain of streptococcal protein G on the surface of *Caulobacter crescentus*: development of an immunoactive reagent [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73( 10): 3245-53.

[5] Ramsland P A, Willoughby N, Trist H M, et al. Structural basis for evasion of IgA immunity by *Staphylococcus aureus* revealed in the complex of SSL7 with Fc of human IgA1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104( 38): 15051-6.

[6] 祁培培, 丁莹莹, 吴莉莉, 等. 人 IgG 四亚类对噬菌体展示 Ig 结合蛋白单结构域随机组合文库的体外进化筛选 [J]. *生物工程学报*, 2012, 28( 9): 1093-105.

[7] 徐文竹, 丁莹莹, 吴莉莉, 等. 不同亚类小鼠 IgG 对 SpA 和 SpG 单结构域构成的随机组合噬菌体文库的体外进化研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49( 9): 1227-33.

[8] He T, Ding Y Y, Feng J J, et al. *In vitro* molecular evolution of AL NEIBMs improved immunoglobulin ( Ig) binding and antibody detection [J]. *J Biotechnol*, 2014, 184: 118-27.

[9] 葛宜兵, 杨旭芳, 杜哲明, 等. 噬菌体展示 HIV-1 Tat38-61 碱性区 51 和 55 位随机突变体文库的构建 [J]. *生物工程学报*, 2011( 5): 755-63.

[10] 沈毅璿, 潘卫, 许燕, 等. 噬菌体展示重组人淋巴毒素突变体库及受体亲和筛选 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2005( 1): 75-80.

[11] Yang H, Cao J, Li L Q, et al. Evolutional selection of a combinatorial phage library displaying randomly-rearranged various single domains of immunoglobulin ( Ig) -binding proteins ( IBPs) with four kinds of Ig molecules [J]. *BMC Microbiol*, 2008, 8: 137.

[12] Tikunova N V, Morozova V V. Phage display on the base of filamentous bacteriophages: application for recombinant antibodies selection [J]. *Acta Naturae*, 2009, 1( 3): 20-8.

[13] Uhlén M, Guss B, Nilsson B, et al. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications [J]. *J Biol Chem*, 1984, 259( 3): 1695-702.

## Construction and evolutionary selection of a combinatorial phage library displaying randomly-rearranged mutant binding domains of SPA

Lin Ziyu<sup>1</sup>, Ding Yingying<sup>2</sup>, Zhou Peng<sup>1</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230032; <sup>2</sup>Dept of Medical Microbiology and Parasitology, The Second Military Medical University, Shanghai 200433)

**Abstract Objective** Using human IgG direct evolutionary selection of a combinatorial phage library displaying randomly-rearranged mutant binding domains of SPA, judging the advantages of the specific combination of different mutations and exploring the relationship between the structure and the function. **Methods** With using overlap PCR, A and C single structure domain mutant fragments in the protein A (SPA) staphylococcus could be obtained. And then used human IgG to affinity screening the phage library, expecting to obtain the integrate molecule with a high combination advantage, through directional transform the particular combinational molecular and evolving it

# EB 病毒 miR-BART4\* 和 miR-BART18-3p 在鼻咽癌中的表达及意义

李璐<sup>1</sup>, 王建红<sup>1</sup>, 黄辉<sup>2</sup>, 范才文<sup>1</sup>, 肖胜军<sup>1</sup>, 熊伟明<sup>2</sup>, 雷迅<sup>2</sup>

**摘要** 目的 分析 EB 病毒(EBV) miRNAs 在鼻咽癌组织中的表达,探索 EBV 诱发鼻咽癌的分子机制,寻找鼻咽癌防治和诊断的生物分子标志物。方法 采用实时荧光定量 PCR 分析 EBV miRNAs ebv-miR-BART4\* 和 ebv-miR-BART18-3p 在 36 例鼻咽低分化鳞癌组织和 32 例慢性鼻咽黏膜炎症组织中的表达水平。结果 ebv-miR-BART4\* 和 ebv-miR-BART18-3p 的表达水平(Ct 值)在鼻咽癌组织中分别为(26.97 ± 2.67)和(27.02 ± 2.32),在鼻咽黏膜炎症组织中的表达水平分别为(38.49 ± 3.05)和(39.39 ± 2.16),两种 EBV miRNAs 在鼻咽癌组织中的表达明显高于鼻咽黏膜炎症组织,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论 EBV 可能通过 ebv-miR-BART4\* 和 ebv-miR-BART18-3p 高表达诱发鼻咽癌,它们是鼻咽癌诊断和防治的潜在生物分子标志物。

**关键词** 鼻咽癌;生物分子标志物;EB 病毒微小 RNA

中图分类号 R 739.63

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)09-1267-04

鼻咽癌是遗传和环境因素共同作用的典型疾病。世界各地鼻咽癌患者的癌组织中均可检出 EB 病毒(EBV) DNA 和病毒核抗原。EBV 伴随鼻咽癌的整个发生过程,尤其是在低分化和未分化的鼻咽癌上皮肿瘤组织中,几乎所有的肿瘤细胞都含有 EBV 基因组<sup>[1]</sup>。EBV 整合可以提高染色体的不稳定性,引起基因表达水平变化,诱导细胞增殖和肿瘤形成的关键基因表达异常,促进细胞恶性转化<sup>[2]</sup>。近来发现的 miRNA 是细胞内的一类非编码 RNA,对基因表达有调节作用,是真核细胞生命活动的调控分子。miRNA 有调控 10% ~ 30% 人类基因的潜能,已经成为研究肿瘤发生与调控机制的一个新领域,研究<sup>[3]</sup>表明 miRNAs 可以控制细胞的生物学进程,如细胞增殖、分化和转移。miRNA 的异常表达可以导致肿瘤的发生,这些异常表达的 miRNAs 是潜在的癌基因或抑癌基因,通过调控下游靶基因参与肿瘤的形成<sup>[4]</sup>。EBV 编码的 miRNAs 参与调控鼻咽癌细胞的生长和分化<sup>[5]</sup>。因此,EBV miRNA 相关研究成果将为鼻咽癌的诊断、预后和治疗提供新的

2015-04-29 接收

基金项目:广西自然科学基金项目(编号:2011GXNSFD018034);广西教育厅科研项目(编号:2013YB168);广西医学科学实验中心开放基金专项项目(编号:KFJJ2010-51);广西科学研究与技术开发计划项目(编号:桂科攻 0592007-1J)

作者单位:<sup>1</sup>桂林医学院生物化学与分子生物学教研室,桂林 541004

<sup>2</sup>桂林医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科,桂林 541001

作者简介:李璐,女,硕士研究生;

雷迅,男,教授,责任作者,E-mail: yypeng\_7@hotmail.com

*in vitro*. **Results** Two libraries could meet the requirement for the *in vitro* molecular evolution. SPA single domain structure A in 29, 30 amino acids site-directed mutation was library (A1), structure C in 36, 37 site-directed mutation was library (C1), SPA single domain structure A insert 3 amino acids after 37 random peptide was library (A<sub>137</sub>), SPA single domain structure C after 20 insert 3 random peptide was library (C<sub>120</sub>). The phage display library which was made up of a random combination of A1 and C1 named "A1C1". And the phage display library which was made up of a random combination of A<sub>137</sub> and C<sub>120</sub> named "A<sub>137</sub>C<sub>120</sub>". The capacity of these two libraries were respectively:  $3.0 \times 10^6$  and  $2.0 \times 10^6$ . The titers were respectively:  $2.3 \times 10^{12}$  and  $2.1 \times 10^{12}$  (TU/ml). These two libraries had evolved completely through four or five times of affinity screening. Besides, Phage-Elisa monoclonal obtained a monoclonal with high OD, and the testing analytical result was A<sub>(Q29K30)</sub>, A<sub>(I29I30)</sub> and A<sub>I37-TQS</sub>. **Conclusion** A fixed point mutation molecules A<sub>(Q29K30)</sub>, A<sub>(I29I30)</sub> and insertion mutation molecular A<sub>I37-TQS</sub> are obtained with the high combining ability. The study shows the relationship of the structure and function of Ig-binding molecules and lays a foundation for directed improvement of Ig-binding molecules and acquirement of new Ig-binding molecules with new Ig-binding characteristics.

**Key words** AC mutants; phage-displayed library; selection; human IgG