

# 基于展示技术的 $\text{Cd}^{2+}$ 结合肽筛选与 酵母重金属吸附研究

冯 侠, 江 年, 陈 颖, 张薇薇, 李学如, 茆灿泉\*

(西南交通大学 生命科学与工程学院 分子进化与应用生物学实验室, 四川 成都 610031)

**摘要:** 利用  $\text{Cd}^{2+}$  螯合树脂, 对噬菌体随机十二肽库进行  $\text{Cd}^{2+}$  结合肽筛选, 并将亲和力较强的结合肽展示在酵母 EBY100 表面, 以期得到耐受和吸附能力具佳的工程菌, 为重金属的生物修复提供新的思路。通过筛选共得到 6 条不同的  $\text{Cd}^{2+}$  结合肽, 其中有 2 条对  $\text{Cd}^{2+}$  亲和力较强, 将其串联展示于酵母细胞表面。与对照菌相比, 酵母工程菌对  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$  的吸附率显著提高。酵母工程菌对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附率随诱导时间的增加而增加, 诱导 24 h 时最高, 达 30.4%, 此时酵母工程菌对  $\text{Ni}^{2+}$  的吸附率达到 32.9%。

**关键词:** 重金属;  $\text{Cd}^{2+}$  结合肽; 噬菌体随机肽库; 展示技术; 酵母

中图分类号: Q789 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)09-0142-04

## Selection of $\text{Cd}^{2+}$ Binding Peptides and Yeast Adsorption of Heavy Metals by Display Technology

FENG Xia, JIANG Nian, CHEN Ying, ZHANG Wei-wei, LI Xue-ru, MAO Can-quan\*

(Lab of Molecular Evolution and Applied Biology, School of Life Science and Engineering,  
Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

**Abstract:**  $\text{Cd}^{2+}$  binding peptides were effectively enriched from the commercially phage 12 random peptide library, and six different  $\text{Cd}^{2+}$  binding peptides were obtained, two which had strong affinity were selected and connected together in series and displayed on yeast surface by gene recombination. The recombinant yeasts showed significant higher adsorption rate for  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  as compared with the control. The recombinant yeasts adsorption rate for  $\text{Cd}^{2+}$  increased with the increase of the induction time, when the induction time was 24 h, the adsorption rate for  $\text{Cd}^{2+}$  reached the maximum (30.4%), and the adsorption rate for  $\text{Ni}^{2+}$  reached 32.9%.

**Key words:** heavy metal;  $\text{Cd}^{2+}$  binding peptides; phage random peptide library; display technology; yeast

重金属污染是世界普遍存在的环境问题。重金属不像有机物一样可以被生物降解, 只能在环境或食物链中发生形态及价态的变化和迁移转化。其中, 以 Cd 为代表的重金属污染是环境治理的难点和热点。除常规的物理、化学修复外, 包括微生物修复在内的生物修复技术为 Cd 等重金属的污染修复

提供了新的、有效的思路与途径<sup>[1-2]</sup>。重金属(微)生物修复具有经济、有效和环境友好等突出优点, 是目前生态环境研究的一个热点, 其难点在于获得高亲和力的重金属结合分子以及对重金属耐受或富集的目标微生物。对于前者, 在自然环境中存在多种天然的金属结合蛋白(肽), 如金属硫蛋白、植物螯合

收稿日期: 2013-04-12

基金项目: 国家“863”计划项目(2006AA06Z353)

作者简介: 冯 侠(1986-), 男, 浙江台州人, 在读硕士研究生, 研究方向: 环境生物技术。E-mail: fengxia\_4672@163.com

\* 通讯作者: 茆灿泉(1962-), 男, 浙江嘉兴人, 教授, 博士, 主要从事分子进化研究。E-mail: maocq@swjtu.edu.cn

素、金属转运蛋白、锌指蛋白、金属蛋白酶等,对多种(重)金属具有亲和力<sup>[3]</sup>。对于后者,目前已报道多种环境微生物对重金属具有较强的耐受或富集作用,如假单胞菌、芽孢杆菌、硫杆菌、肠杆菌等。

以噬菌体展示为代表的生物文库与展示技术不仅在文库构建、抗原表位筛选和新受体及天然配体结构域的识别和鉴定、药物筛选、设计和制备等方面获得了巨大的成功,而且在金属结合肽的筛选及重金属微生物修复等领域也有重要的研究价值和作用<sup>[4]</sup>。噬菌体展示技术是利用噬菌体的表面蛋白(主要为 pⅢ、pVⅢ蛋白)将 DNA 片段或随机序列通过基因工程的方法融合展示在噬菌体表面,由此构建成为高分子多样性(达  $10^{12} \sim 10^{13}$  pfu/mL)的噬菌体随机展示肽库或展示系统,利用配体亲和力筛选出所需的结合肽。通过噬菌体文库进行金属结合肽筛选,国内外已有许多报道,但迄今为止,所报道的金属结合肽主要是针对 Ni、Zn 等一般重金属元素<sup>[5-7]</sup>,针对 Cd 等高毒元素的结合肽筛选则鲜有报道,用于重金属结合肽展示的微生物工程菌研究也主要在细菌水平<sup>[8-9]</sup>,用于酵母菌展示的研究也鲜有报道。鉴于此,本研究利用噬菌体十二肽库筛选  $\text{Cd}^{2+}$  结合肽,并将其展示在酵母 EBY100 表面,以期得到耐受和吸附能力具佳的工程菌,为重金属污染的生物修复提供新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

酵母展示质粒 pYD1、酵母菌株 EBY100 和 Ni-NTA Agarose 树脂购自 Invitrogen 公司,噬菌体随机十二肽库( $1.5 \times 10^{13}$  pfu/mL)和宿主细菌 ER2738 购自 New England Biolabs 公司,原子吸收分光光度计购自 Perkin Elmer 公司。

### 1.2 $\text{Cd}^{2+}$ 螯合树脂的制备

吸取 500  $\mu\text{L}$  的 Ni-NTA Agarose 树脂,用 500  $\mu\text{L}$  TBS[150 mmol/L Tris-HCl(pH 值 7.2),150 mmol/L NaCl]洗涤树脂 2 次,加入 0.5 mol/L EDTA(pH 值 8.0)洗涤 2 次,最后用 0.1% TBST(TBS,0.1% Tween-20)洗涤 3 次。加入  $\text{Cd}^{2+}$  处理过夜,离心,用 TBS、0.1% 的 TBST 依次洗涤 3 次,分装,4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.3 $\text{Cd}^{2+}$ 结合肽的筛选

取加载  $\text{Cd}^{2+}$  和未加载  $\text{Cd}^{2+}$  的树脂各一离心管(1 mL),用 500  $\mu\text{L}$  BSA(1 mg/mL)150 r/min 封闭

1 h,2 000 r/min 离心 20 s,加入  $5 \times 10^{10}$  pfu/mL 噬菌体随机十二肽库,150 r/min 孵育 1 h,离心,用 0.1% TBST 洗涤 5 次,最后用 0.2 mol/L 甘氨酸(pH 值 2.2)洗脱 2 次,合并 2 次洗脱液,稀释涂板测定加载和未加载  $\text{Cd}^{2+}$  的洗脱液滴度,计算 P/N 值(加载  $\text{Cd}^{2+}$  树脂的洗脱液滴度/未加载  $\text{Cd}^{2+}$  树脂的洗脱液滴度)。保留 10% 洗脱液,扩增其余加载  $\text{Cd}^{2+}$  树脂的噬菌体洗脱液,测定滴度。同样滴度的噬菌体( $5 \times 10^{10}$  pfu/mL)用于下一轮筛选,重复筛选 4 轮。

### 1.4 $\text{Cd}^{2+}$ 结合肽对 $\text{Cd}^{2+}$ 螯合树脂亲和力的测定

对获得的单克隆噬菌体进行扩增,测定滴度,然后进行加载  $\text{Cd}^{2+}$  和未加载  $\text{Cd}^{2+}$  树脂的单克隆噬菌体亲和力测定,用 P/N 值表示。步骤同 1.3,加入同等滴度筛选所得的噬菌体代替原库噬菌体。

### 1.5 多肽序列的确定及序列比对

制备单克隆噬菌体的 ssDNA,并进行测序(由上海生工生物工程有限公司完成),按照三联体密码子原则确定目的多肽序列。然后采用生物信息软件 Clustal X 对所得序列进行多重比对,分析序列特征、组成。

### 1.6 酵母工程菌的构建

根据单克隆噬菌体的  $\text{Cd}^{2+}$  树脂亲和力测定结果,确定亲和力较高的多肽“HSRQLMHDMH”、“SPSHPPNLWPHH”的串联序列(SPSHPPNLWPHHHSRQLMHDMHTK)作为金属结合肽,用于酵母工程菌金属结合肽(MBP)表面展示。按照三联体密码子原则,进行 DNA 编码序列设计与合成,序列末端引入终止密码子 TAA,两端分别加 *Bam*H I 和 *Bgl* II 粘性末端,序列设计为 5'-GATCC CCG TCT CAC CCG CCA AAT CTG TGG CCA CAC CAT CAC AGT AGA CAG CTG ATG CAC GAT ATG CAT ACA AAG TAA-3'和 5'-GATCT TA CTT TGT ATG CAT ATC GTG CAT CAG CTG TCT ACT GTG ATG GTG TGG CCA CAG ATT TGG CGG GTG AGA CGGG-3',由上海生工生物工程有限公司合成序列,经序列退火并磷酸化后与经过 *Bam*H I 酶切去磷酸化的 pYD1 载体连接,依次转化细菌、扩增并转化酵母 EBY100。经限制性酶切和 DNA 测序确定阳性克隆,获得 pYD1-MBP-EBY100 酵母重组子。

### 1.7 酵母工程菌对重金属吸附程度的测定

挑取单菌落酵母工程菌和酵母 EBY100(对照)

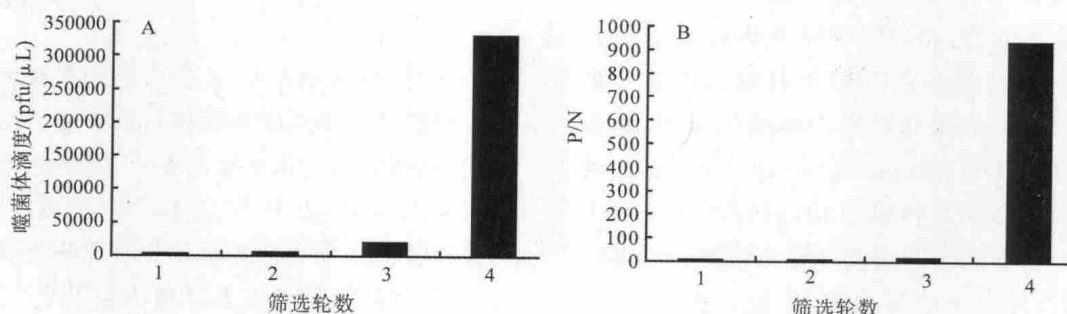
置于 YPD 培养基中,于 30 ℃、200 r/min 培养 24 h,5 000 r/min 离心收集菌体,将菌体重悬于含半乳糖的 YPD 培养基中进行诱导表达。诱导表达后分为 2 组,一组加入  $\text{CdSO}_4$  溶液,使  $\text{Cd}^{2+}$  的终质量浓度达 14 mg/mL,然后分别诱导 12、24 h。另一组加入同等质量浓度的  $\text{NiCl}_2$ ,诱导 24 h,然后 10 000 r/min 离心,获得上清液。以空白培养基为对照,原子吸收分光光度计测定  $\text{Cd}^{2+}$  和  $\text{Ni}^{2+}$  质量浓度,然后计算

吸附率。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\text{Cd}^{2+}$ 结合肽的筛选

由图 1 可以看出,随着筛选轮数的增加,噬菌体的洗脱滴度及 P/N 值不断增加。经 4 轮筛选后,噬菌体有效富集,其滴度达最大,为  $3.3 \times 10^5$  pfu/ $\mu\text{L}$  (图 1A);噬菌体 P/N 值达最大,为 912 (图 1B)。



A. 筛选过程中滴度的变化; B. 筛选过程中 P/N 值的变化

图 1 噬菌体在  $\text{Cd}^{2+}$  结合肽筛选过程中的富集

### 2.2 $\text{Cd}^{2+}$ 结合肽的获得

挑取筛选 3 轮和 4 轮的噬菌体,制备 ssDNA,测序,共获得 6 条 DNA 编码多肽序列,该 6 条序列均不相同,无一致序列存在,序列含有 2~4 个相对高比例的组氨酸(表 1)。

表 1  $\text{Cd}^{2+}$  结合肽序列

结合肽名称	结合肽序列
K-3-1	HHFPSYRQDHYY
K-3-3	PSAIAFHNPMDH
K-3-4	VAFSSWHQNVSH
K-4-1	LLGHRSFHPSSH
K-4-2	SPSHPPNLWPHH

### 2.3 $\text{Cd}^{2+}$ 结合肽对 $\text{Cd}^{2+}$ 螯合树脂的亲合力

由表 2 可见,6 种噬菌体多肽对  $\text{Cd}^{2+}$  的亲合力各不相同,其中结合肽 K-3-2、K-4-2 相对较高,其 P/N 值分别为 66.67 和 22.22,故在下一步试验中作为  $\text{Cd}^{2+}$  结合肽用于酵母工程菌展示重金属吸附研究。

表 2 不同噬菌体结合肽对  $\text{Cd}^{2+}$  螯合树脂的亲合力

参数	结合肽名称					
	K-3-1	K-3-2	K-3-3	K-3-4	K-4-1	K-4-2
P/N 值	2.67	66.67	2.70	1.77	11.90	22.22

### 2.4 酵母工程菌对重金属的吸附作用

由表 3 可见,将 2.3 亲和测定中所得亲合力较

高的 K-3-2、K-4-2 串联展示在酵母 EBY100 细胞表面,在诱导表达 12、24 h 后,酵母工程菌对  $\text{Cd}^{2+}$  吸附率分别达到 26.3%、30.4%,分别显著、极显著高于对照菌,并且随着展示蛋白诱导时间的增加,酵母工程菌对  $\text{Cd}^{2+}$  吸附能力增强。同样,在诱导表达 24 h 后,pYD1-MBP-EBY100 工程菌对  $\text{Ni}^{2+}$  也呈现极显著的吸附作用,吸附率达 32.9%(表 4)。

表 3 酵母工程菌对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附情况

组别	诱导时间/h	$\text{Cd}^{2+}$ 吸附率/%	P 值
EBY100	12	10.2	
	24	10.9	
pYD1-MBP-EBY100	12	26.3	0.043 8*
	24	30.4	0.001 5**

注: \* 代表在差异显著 ( $P < 0.05$ ), \*\* 代表差异极显著 ( $P < 0.01$ ),下同。

表 4 酵母工程菌对  $\text{Ni}^{2+}$  的吸附情况

组别	诱导时间/h	$\text{Ni}^{2+}$ 吸附率/%	P 值
EBY100	24	20.2	
pYD1-MBP-EBY100	24	32.9	0.000 2**

## 3 结论与讨论

本研究是在本实验室前期  $\text{Ni}^{2+}$  等重金属离子随机肽库筛选的基础上开展的基于噬菌体随机十二肽库的  $\text{Cd}^{2+}$  结合肽筛选<sup>[10]</sup>,噬菌体滴度及 P/N 值

随着筛选轮数的增加而提高,表明筛选过程中具亲和力的噬菌体得到有效富集。共获得了6条不同的多肽序列,其对  $\text{Cd}^{2+}$  树脂的亲合力程度不同。序列分析表明,无一致序列存在,序列多含组氨酸,但值得注意的是,与 Ni、Co 等重金属离子结合肽的筛选结果稍有差异的是,所得序列中组氨酸相对较少,一般为2~3个。筛选得到的序列中未发现半胱氨酸,这可能与噬菌体筛选中半胱氨酸不能稳定存在有关。

已有研究表明,酵母菌具有强的重金属吸附作用<sup>[11-12]</sup>,其易于培养,无毒副作用,而且在分子水平上容易操控,目前已经有许多关于使用酿酒酵母作为重金属结合肽宿主菌的报道<sup>[12]</sup>。本实验室也发现,马克思克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*) YS-K1 菌株在 Cd 等重金属吸附方面具有较强的作用(数据尚未发表)。

有研究<sup>[13]</sup>报道,重组酵母在诱导12~24 h 时具有最好的表达量。从表3可以看出,在诱导24 h 后,重组酵母对重金属具有较高的吸附率。为了验证筛选的重金属结合肽是否对其他重金属也有修复作用,又开展了工程菌对  $\text{Ni}^{2+}$  的吸附试验,结果显示,工程菌对  $\text{Ni}^{2+}$  也具有很好的吸附作用,证明所获得的金属结合肽对 Cd、Ni 重金属具有广谱的吸附作用,这与 Ni 金属筛选结合肽具有多个组氨酸的特征也相一致。

本研究为 Cd 等重金属污染的微生物修复及微生物—其他生物联合修复提供了一条新的思路与方法。

#### 参考文献:

- [1] Singh S, Kang S H, Mulchandani A, *et al.* Bioremediation: Environmental clean-up through pathway engineering[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19:437-444.
- [2] Weyens N, Lelie D V, Taghavi S, *et al.* Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation [J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27(10):591-598.
- [3] 徐柳,宋琴,茆灿泉. 金属结合蛋白(肽)与环境重金属生物修复[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(4):39-43.
- [4] Pande J, Szewczyk M M, Grover A K. Phage display: Concept, innovations, applications and future[J]. Biotechnology Advances, 2010, 28(6):849-858.
- [5] Day J W, Kim C H, Smider V V, *et al.* Identification of metal ion binding peptides containing unnatural amino acids by phage display[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2013, 23(9):2598-2600.
- [6] Patwardhan A V, Goud G N, Koepsel R R, *et al.* Selection of optimum affinity tags from a phage-displayed peptide library application to immobilized copper(II) affinity chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 1997, 787(1-2):91-100.
- [7] Mooney J T, Fredericks D, Hearn M T. Use of phage display methods to identify heptapeptide sequences for use as affinity purification 'tags' with novel chelating ligands in immobilized metal ion affinity chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(1):92-99.
- [8] Valls M, Atrian S, de Lorenzo V, *et al.* Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(6):661-665.
- [9] Samuelson P, Wernérus H, Svedberg M, *et al.* Staphylococcal surface display of metal-binding polyhistidyl Peptide[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(3):1243-1248.
- [10] 易卓林, 佟鑫, 马春燕, 等.  $\text{Ni}^{2+}$  高效结合肽的筛选与作用研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(5):745-748.
- [11] Wang J, Chen C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review [J]. Biotechnology Advances, 2006, 24(5):427-451.
- [12] Morin I, Cuillel M, Lowe J, *et al.*  $\text{Cd}^{2+}$ -or  $\text{Hg}^{2+}$ -binding proteins can replace the  $\text{Cu}^{+}$ -chaperone Atx1 in delivering  $\text{Cu}^{+}$  to the secretory pathway in yeast[J]. FEBS Letters, 2005, 579:1117-1123.
- [13] Bradbury A. Molecular library technologies at the millennium[J]. Trends Biotechnol, 2000, 18(4):131-133.