

雷公藤内酯醇靶蛋白的筛选及其结合的初步验证

杨旭光¹ 徐晓煜¹ 李家璜¹ 姚其正² 朱彤阳¹ 华子春¹ 郑伟娟^{* 1}

¹(南京大学医药生物技术国家重点实验室, 生命科学学院, 南京 210093)

²(中国药科大学药学院, 南京 210009)

摘 要 采用噬菌体展示肽库技术筛选雷公藤内酯醇的靶蛋白, 得到了一个肽段, 并通过酶联免疫吸附 (ELISA) 和免疫共沉淀验证了该片段对雷公藤内酯醇的结合特异性。用 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 进行序列对比后, 找到了 77 个匹配序列, 其中最为匹配的序列是人类类固醇生成因子-1 (hSF-1), 因此 hSF-1 可能是雷公藤内酯醇的一个潜在受体。在大肠杆菌中表达纯化了 hSF-1 的配体结合域 (LBD), 荧光光谱实验表明雷公藤内酯醇对 hSF-1-LBD 有荧光淬灭作用, 等温滴定量热 (ITC) 实验表明雷公藤内酯醇与 hSF-1-LBD 发生焓驱动的特异性结合, 表面等离子体共振 (SPR) 实验表明雷公藤内酯醇可以与 hSF-1-LBD 剂量依赖性结合, 这些都证实了 hSF-1 与雷公藤内酯醇存在特异性相互作用。

关键词 雷公藤内酯醇; 类固醇生成因子-1; 噬菌体随机肽库; 荧光光谱; 等温滴定量热

1 引言

雷公藤内酯醇是从中草药雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook F.) 根中提取的一种二萜内酯活性化合物。雷公藤用于治疗类风湿性关节炎、发烧、水肿以及各种痈肿 (carbuncles)^[1]。美国国家卫生研究院资助的一项临床试验证实, 雷公藤对于治疗类风湿性关节炎具有显著疗效^[2,3]。雷公藤内酯醇具有多种生物活性, 包括强力的抗炎及免疫抑制活性, 有效的抗增殖及其抗癌作用等^[4,5]。陆静等^[6]采用高效液相色谱分离雷公藤内酯醇的相关衍生物, 探索了该药物的稳定性和可能的降解机理。有研究表明, 雷公藤内酯醇可以诱导细胞凋亡, 但具体是通过膜受体途径还是线粒体途径起作用^[7~9]以及雷公藤内酯醇诱导细胞凋亡是否依赖于 p53 都尚有争议^[10,11]。目前对雷公藤内酯醇作用机理的研究主要集中在雷公藤内酯醇的作用结果上, 缺少对雷公藤内酯醇靶蛋白的确定和作用途径等核心问题的研究^[12]。虽然 Leuenroth 等曾找到一些雷公藤内酯醇可能的结合蛋白, 但是尚缺乏直接的结合数据和深入的研究^[13~15]。以往的研究显示, 雷公藤内酯醇对多种生物学途径、多种生物分子都有影响, 因此雷公藤内酯醇可能存在多个作用靶点, 筛选雷公藤内酯醇的靶蛋白, 对深入了解其作用机制、阐明其作用途径, 是十分必要的。

雷公藤内酯醇很难被直接标记和检测, 迄今没有雷公藤内酯醇的特异性抗体, 而用 [³H] 标记雷公藤内酯醇又非常复杂^[13]。噬菌体肽库展示技术是筛选生物分子多肽配体的一种有用工具, 已经成功用于筛选小分子化合物、蛋白质甚至细胞的多肽配体^[16~18], 因此用噬菌体肽库展示技术筛选雷公藤内酯醇的多肽配体确定其可能的靶蛋白, 可能是一种有效的途径。

雷公藤内酯醇不含游离氨基或羧基, 不能直接包被到多孔板上。用琥珀酸酐修饰雷公藤内酯醇, 并将它与卵清蛋白偶联, 命名为 Tri-OVA^[19]。由于增加了游离的羧基, Tri-OVA 可以很容易地包被到多孔板上, 成为雷公藤内酯醇配体筛选及检测的理想的起始材料。本研究采用两种噬菌体展示肽库 (线性 7 肽库和环 7 肽库) 筛选雷公藤内酯醇多肽配体, 最终从环 7 肽库中富集到一组七肽序列。ELISA 和免疫沉淀检测均证明, 出现频率最高的七肽序列的噬菌体克隆 (C7C-1) 与雷公藤内酯醇亲和力最高。用 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 进行序列对比后, 确定其中得分较高的人类固醇生成因子 1 (Human steroidogenic factor-1, hSF-1) 为雷公藤内酯醇可能的靶蛋白之一。在大肠杆菌中表达并纯化了

2011-05-16 收稿; 2011-09-30 接受

本文系国家自然科学基金支持 (No81072712)

* E-mail: wjzheng@nju.edu.cn

hSF-1 的配体结合结构域(LBD),通过荧光光谱实验、等温滴定量热(ITC)实验和表面等离子体共振(SPR)实验验证了 hSF-1 与雷公藤内酯醇的特异性结合,证明雷公藤内酯醇在体外可以与 hSF-1 特异性结合,但这种结合较弱。鉴于雷公藤内酯醇生物学效应的多样性和广泛性,推测雷公藤内酯醇可能存在多个生物学靶点和其它特异性受体,需要进一步的筛选和研究。

2 实验部分

2.1 肽库及宿主菌

噬菌体随机环 7 肽库(Ph. D. -C7C, 美国 New England BioLabs 公司)由南京大学沈萍萍馈赠。肽库利用大肠杆菌丝状噬菌体 M13 构建,随机肽库融合在次要衣壳蛋白 pIII 的 N 端,在大肠杆菌 ER2738 菌株中维持和扩增。噬菌体的多样性为 1.2×10^9 个转化子,滴度为 2×10^{11} pfu/ μ L,滴度测定按照说明书操作。

2.2 Tri-OVA 的包被

雷公藤内酯醇购自美国 Sigma 公司。雷公藤内酯醇的修饰,及其与卵清蛋白(OVA)的偶联参见文献[19]。用包被缓冲液(0.1 mol/L NaHCO_3 , pH 8.6)将偶联产物 Tri-OVA 配成 5 g/L, 100 μ L/孔;微孔板用保鲜膜覆盖后放入增湿容器,4 $^\circ\text{C}$ 过夜。TBST (20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5)洗涤 3 次,拍干;对照孔用相同浓度的 OVA 包被。用 5 g/L BSA 的包被液封闭,200 μ L/孔,37 $^\circ\text{C}$ 湿盒中作用 3 h, TBST 洗涤 3 次,拍干。

2.3 噬菌体环 7 肽库的筛选

10 μ L 原始肽库(1×10^{11} pfu/ μ L)用 90 μ L TBS 稀释后加入对照孔中,室温孵育 30 min,以去除与 OVA 或者平板结合的噬菌体,上清转移到包被 Tri-OVA 的孔中。孵育 1 h 后弃上清液, TBST 洗涤 10 次。加入 100 μ L 含 0.1% BSA 的 0.2 mol/L Gly-HCl 缓冲液(pH 2.2)洗脱结合噬菌体,室温孵育 10 min 后加入 15 μ L 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 9.1)中和洗脱液。收集后即第一轮洗脱噬菌体(Out-put phage)。按照说明书测定噬菌体滴度并进行扩增。

后继筛选过程按上述步骤进行,但 TBST 中的 Tween 20 浓度增加至 0.5%,洗涤次数增加至 20 次。第四轮、第五轮分别随机挑取 20 和 40 个克隆进行 DNA 测序。

2.4 检测克隆对雷公藤内酯醇的亲合力

2.4.1 ELISA 方法 如上所述制备 Trip-OVA 包被孔和对照孔,每孔加入 2×10^{11} pfu 的噬菌体克隆,室温孵育 2 h。TBS-0.5% Tween20 洗板 6 次。然后每孔加入 100 μ L 1:1000 稀释的 HRP-anti-M13 抗体,室温孵育 1 h。TBST 洗板 6 次。加入 200 μ L 的底物液 ABTS(含 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid)的柠檬酸缓冲液, pH 4.0, 30% H_2O_2)。室温孵育 30 min 后用酶标仪检测 410 nm 的 OD 值。

2.4.2 免疫沉淀法 雷公藤内酯醇抗血清(本实验室制备)与 Protein G-琼脂糖 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜。同时将筛选到的噬菌体克隆(5×10^{10} pfu)与 2 μ g Trip-OVA 在 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜。相同数量的噬菌体克隆与 2 μ g OVA 孵育 12 h 后作为阴性对照。将抗血清和 Protein G-琼脂糖的混合物(总体积 40 μ L)分别加到噬菌体和雷公藤内酯醇的混合物管及阴性对照管中,4 $^\circ\text{C}$ 旋转混匀 5 h。按如下方法洗 10 次:加 750 μ L TBS-0.1% Tween 20 温和混匀,4 $^\circ\text{C}$ 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,沉淀重悬并再次洗涤。最终沉淀重悬于 100 μ L TBS-0.1% Tween 20 中并检测其噬菌体滴度。

2.5 hSF-1 配体结合域(LBD)的克隆构建和表达纯化

根据 Gene Bank 中人 SF-1 的基因序列(NM-004959),设计引物扩增 hSF-1 的配体结合结构域(G220-T461),引物序列如下:

上游引物:5'-GGAATTCATATGGGGCCCAACGTGCCTGAGCT-3';

下游引物:5'-AAACTCGAGTCAAGTCTGCTTGGCTTCGACGATTTTC-3';

Trizol 法提取人肾上腺组织(江苏省中医院馈赠)的总 RNA,以逆转录后的 cDNA 为模板 PCR 扩增 hSF-1-LBD 片段,连接到 pET28a 载体(Invitrogen)构建重组质粒 pET28a-hSF-1-LBD。重组质粒转化表达宿主菌 BL21 Star,3 mL 过夜菌转接至 400 mL LB 中,37 $^\circ\text{C}$ 培养至 $\text{OD}_{600} = 0.3$,加入 750 μ mol/L IPTG,20 $^\circ\text{C}$ 培养 14 h。离心收集菌体,20 mL PBS 重悬,超声后 12000 r/min 离心 15 min,上清液过 Ni^{2+}

柱。以含 50 mmol/L 咪唑的 PBS 洗去杂蛋白,含 250 mmol/L 咪唑的 PBS 洗脱目的蛋白,12% SDS-PAGE 检测蛋白纯度。

2.6 验证雷公藤内酯醇与 hSF-4-LBD 的结合的实验

2.6.1 荧光光谱方法 用磷酸盐缓冲液(pH 7.0)溶解蛋白和雷公藤内酯醇,蛋白浓度为 50 mg/L,配制雷公藤内酯醇成与蛋白的摩尔比分别为 0.5,1,2,5 和 10 的溶液。先加入 200 μ L 蛋白于石英比色皿中,再加入 12 μ L 不同浓度的雷公藤内酯醇,室温放置 15 min 后用荧光分光光度计(F7000,日本日立公司)检测,激发波长 280 nm,记录 290~450 nm 的发射谱。发射与激发狭缝宽度为 2.5 nm,扫描速度为 60 nm/min,记录 hSF-4-LBD 与雷公藤内酯醇相互作用的同步荧光光谱。每个数据点测量 3 次,并扣除背景,作荧光校正。

2.6.2 等温滴定量热(ITC)方法 用 Microcal iTC200 等温滴定量热仪(美国 Microcal 公司)检测 hSF-4-LBD 与雷公藤内酯醇的结合。雷公藤内酯醇用 PBS 稀释至 0.4 g/L,DMSO 的终浓度为 8%。hSF-4-LBD 蛋白用 PBS 稀释至 1.8 g/L,加入 8% DMSO。60 μ L 雷公藤内酯醇溶液加入注射器,200 μ L 蛋白加入样品池。25 $^{\circ}$ C 恒温,注射器转速为 1000 r/min,起始注射 0.5 μ L,随后以 120 s 的时间间隔注射 19 次,每次 20 μ L。用 ITC200 自带的 Origin7 软件进行数据分析。

3 结果与讨论

3.1 与雷公藤内酯醇特异性结合的多肽克隆的筛选

洗脱的噬菌体滴度除以加入的噬菌体滴度即为回收率,从表 1 可见,从第 1 轮到第 4 轮,回收率从 2.5×10^{-9} 上升到了 3.0×10^{-7} 。而第 5 轮的回收率比第 4 轮只有轻微增加,表明 5 轮检测后,结合雷公藤内酯醇的噬菌体得到了有效富集。

3.2 对筛选到的噬菌体克隆进行 DNA 测序

随机选取第 4 轮筛选到的 20 个克隆测序,其中有 3 个具有相同的七肽序列:SKAYPHS。随机选取第 5 轮筛选到的 40 个克隆进行测序,得到 4 种重复序列,其中包括第 4 轮得到的重复序列 SKAYPHS,并且重复率最高(7/40),结果见表 2。

表 1 每一轮的噬菌体回收率

Table 1 Recovery of phage in rounds of panning C7 library

轮数 Rounds	加入噬菌体 Input phage (pfu)	洗脱噬菌体 Output phage (pfu)	回收率 Recovery
1	2.0×10^{11}	5×10^2	2.5×10^{-9}
2	2.0×10^{11}	3×10^3	1.5×10^{-8}
3	1.2×10^{11}	7×10^3	5.8×10^{-8}
4	1.8×10^{11}	5.2×10^2	2.9×10^{-9}
5	5.0×10^{10}	1.5×10^4	3.0×10^{-7}

表 2 第 5 轮筛选得到的重复的多肽序列

Table 2 Repeated peptide sequences of round 5

克隆编号 Clone number	多肽序列 Peptide sequences	重复次数 Repeated times
C7C-1	SKAYPHS	7
C7C-2	TGHQMLS	2
C7C-3	SQIAPAT	2
C7C-4	QPAQSW	2

3.3 克隆 C7C-1 对雷公藤内酯醇的亲合力

3.3.1 ELISA 检测筛选结果 ELISA 检测结果如图 1 所示,克隆 C7C-1 亲合力最高,与 SKAYPHS 序列出现频率最高一致。Tri-OVA 包被孔的 OD 值是 OVA 包被孔的 7 倍,而在阴性对照中两个孔的 OD 值相近。图中数据均为 3 次检测结果的平均值。

3.3.2 免疫沉淀法检测结果 结果如图 2 所示,C7C-1 对雷公藤内酯醇亲合力最高,与 ELISA 结果一致。C7C-1 对 Tri-OVA 的结合是 OVA 对照的 22.8 倍,表明免疫沉淀法相比 ELISA 具有更高的敏感性。图中数据为 3 次检测结果的平均值。

3.4 C7C-1 克隆序列比对

对筛选到的重复频率最高的七肽序列 SKAYPHS 用 BLAST 对 NCBI 数据库进行搜索后,得到了 77 个蛋白序列。综合考虑,确定其中得分较高的人类固醇生成因子 1(hSF-1)为雷公藤内酯醇可能的靶蛋白之一。

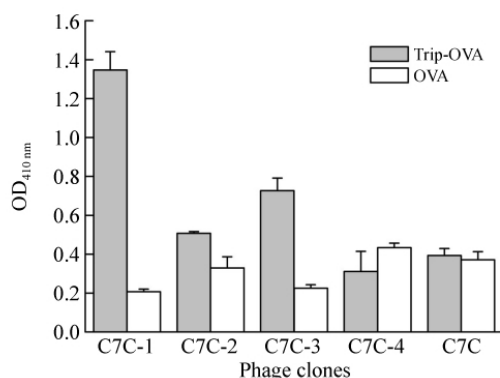


图 1 筛选多肽克隆亲和力的 ELISA 检测结果

Fig. 1 Detection of selected phage clones by ELISA

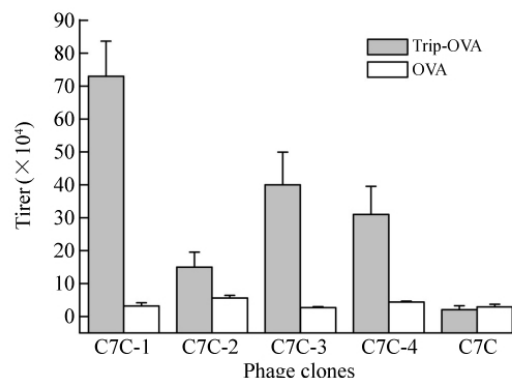


图 2 筛选多肽克隆亲和力的免疫共沉淀检测结果

Fig. 2 Detection of selected phage clones by immunoprecipitation assay

3.5 hSF-1 配体结合域(LBD)的克隆构建和表达纯化

根据 NCBI 中 hSF-1 基因的保守序列设计引物,以人肾上腺组织的 cDNA 为模板,PCR 扩增获得了大小为 751 bp 的目的条带(图 3)。

构建的重组质粒 pET28a-hSF-1-LBD 经测序验证后,在大肠杆菌中诱导表达,SDS-PAGE 结果如图 4 所示,诱导后得到了目的蛋白。经 Ni^{2+} 柱纯化,纯度约为 97.3%。

3.6 验证雷公藤内酯醇与 hSF-1-LBD 的结合

3.6.1 荧光光谱方法 荧光光谱检测结果(图 5)显示,在 280 nm 激发波长下,hSF-1-LBD 在 330 nm 处有较强的荧光发射峰。随着雷公藤内酯醇浓度的增加,hSF-1-LBD 的内源荧光强度在 330 nm 附近有规律地降低,说明雷公藤内酯醇对 hSF-1-LBD 的荧光有猝灭现象。激发波长 280 nm 时色氨酸最大荧光发射峰为 330 nm,而复合体系在 330 nm 处荧光强度显著降低,表明雷公

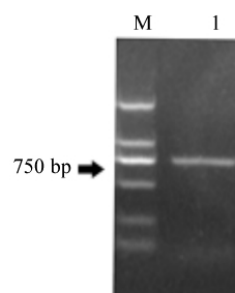


图 3 hSF-1-LBD 序列 PCR 产物凝胶电泳图

Fig. 3 Gel electrophoresis diagram of hSF-1-LBD PCR products

M. DNA 分子量标准(DNA marker); 1. 扩增产物(PCR products)。

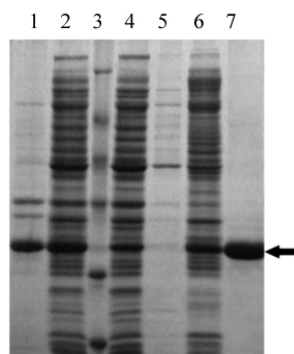


图 4 hSF-1-LBD 的表达纯化的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 4 SDS-PAGE diagram of hSF-1-LBD expression and purification

1. 超声后的沉淀(Precipitate after sonication); 2. 超声后的上清液(Supernatant after sonication); 3. 蛋白分子量标准(Protein marker); 4 5. 穿透组分(Penetration); 6. 50 mmol/L 咪唑洗脱液(Elution by 50 mmol/L imidazole); 7. 250 mmol/L 咪唑洗脱液(Elution by 250 mmol/L imidazole); 箭头标注为目的蛋白(Arrow indicates the target protein)。

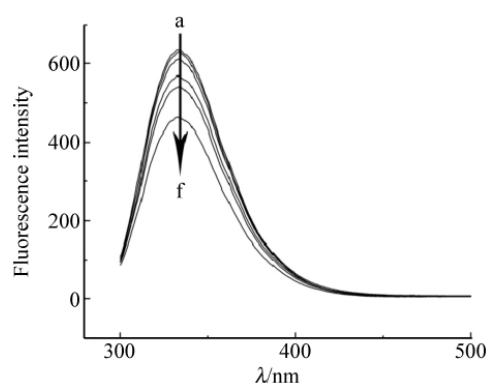


图 5 雷公藤内酯醇对 hSF-1-LBD 荧光光谱的影响

Fig. 5 Influence of triptolide on hSF-1-LBD fluorescence spectrum by triptolide

a. 25 mg/L hsf-1-LBD 蛋白(hsf-1-LBD protein); b ~ f. 蛋白与雷公藤内酯醇的摩尔比分别为 1: 0.5, 1: 1, 1: 5, 1: 10, 1: 20 (Mol ratio of protein and triptolide: 1: 0.5, 1: 1, 1: 5, 1: 10, 1: 20)。

藤内酯醇与 hSF-4-LBD 结合时接近色氨酸。测定雷公藤内酯醇溶液在激发波长 280 nm 处无荧光, 因此可忽略内滤光效应。滴定过程中, 加入雷公藤内酯醇的累加体积远小于蛋白溶液体积, 可忽略稀释效应对蛋白荧光强度的影响。根据图 5 中的数据, 由 Stern-Volmer 方程: $F_0/F = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + K_q \tau_0 [Q]$, 计算得到雷公藤内酯醇对 hSF-4-LBD 的荧光猝灭速率常数 K_q 约为 $2.0 \times 10^{12} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$, 远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭速率常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ 。说明雷公藤内酯醇对于 hSF-4-LBD 的荧光猝灭是由于二者形成了复合物而引起的静态猝灭。

3.6.2 ITC 方法 ITC 实验结果(图 6)表明, 雷公藤内酯醇与 hSF-4-LBD 反应的热力学参数 ΔH 为 -507.2 cal/mol , ΔS 为 $18.2 \text{ cal}/(\text{mol} \cdot \text{deg})$, 反映了 hSF-4-LBD 与雷公藤内酯醇发生了焓驱动的特异性相互作用, 这种相互作用符合单位点结合模式。但平衡常数($S_D = 2.24 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}$)较小, 表明二者的结合作用比较弱。本研究采用表面等离子体共振 (SPR) 方法的结果显示, 雷公藤内酯醇流经偶联 hSF-4-LBD 的芯片后, 芯片表面的 RU 值升高, 证实了雷公藤内酯醇与 hSF-4-LBD 蛋白发生了结合, 并呈剂量依赖性芯片。

3.7 雷公藤酯醇厚的生物学效应

雷公藤内酯醇具有多种明确的生物学效应, 而且前期的构效关系研究显示雷公藤内酯醇的不同生物学效应可能依赖于不同的功能基团, 因此可以认为雷公藤内酯醇可能存在多种不同的靶蛋白, 不同的生物学效应与不同的靶蛋白及不同的作用途径之间存在对应关系。这种对应关系将有助于指导药物分子的修饰和改造, 开发高效低毒、特异性针对某一条作用途径起作用的药物分子。

通过噬菌体表面展示肽库技术筛选到与雷公藤内酯醇特异性结合的氨基酸序列, 并通过序列比对确定 hSF-4 可能是雷公藤内酯醇的靶蛋白之一。实验证明, 雷公藤内酯醇与 hSF-4 的配体结合结构域 (LBD) 存在特异性的相互作用, 虽然这种作用力比较弱, 但是属于直接的相互作用。当然体外研究不能代表在细胞内的真实情况, 还需要在细胞水平上进一步验证 hSF-4 与雷公藤内酯醇的特异性作用。

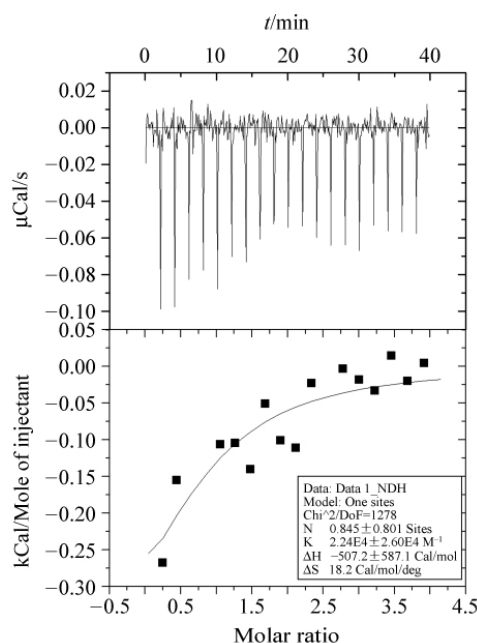


图6 ITC 验证雷公藤内酯醇与 hSF-4-LBD 相互作用
Fig. 6 Isothermal titration calorimetry (ITC) experiments for interactions of triptolide with hSF-4-LBD

References

- Ding G S. *Clin. Ther.*, **1987**, 9(4): 345 ~ 357
- Tao X, Cush J J, Garret M, Lipsky P E. *J. Rheumatol.*, **2001**, 28(10): 2160 ~ 2167
- Tao X, Younger J, Fan F Z, Wang B, Lipsky P E. *Arthritis Rheum*, **2002**, 46(7): 1735 ~ 1743
- Lu H, Hachida M, Enosawa S, Li X K, Suzuki S, Koyanagi H. *Transplant Proc.*, **1999**, 31(5): 2056 ~ 2057
- Lue Y, Sinha Hikim A P, Wang C, Leung A, Baravarian S, Reutrakul V, Sangsawan R, Chaichana S, Swerdloff R S. *J. Androl.*, **1998**, 19(4): 479 ~ 486
- LU Jing, XIANG Li-Li, JI Min, CHEN Dong-Ying. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2011**, 39(8): 1266 ~ 1269
陆静, 象丽丽, 季旻, 陈东英. *分析化学*, **2011**, 39(8): 1266 ~ 1269
- Wang X, Matta R, Shen G, Nelin L D, Pei D, Liu Y. *J. Mol. Med.*, **2006**, 84(5): 405 ~ 415
- Wan C K, Wang C, Cheung H Y, Yang M, Fong W F. *Cancer Lett.*, **2006**, 241(1): 31 ~ 41
- Carter B Z, Mak D H, Schober W D, McQueen T, McQueen T, Harris D, Estrov Z, Evans R L, Andreeff M. *Blood*, **2006**, 108(2): 630 ~ 637
- Jiang X H, Wong B C, Lin M C, Zhu G H, Kung H F, Jiang S H, Yang D, Lam S K. *Oncogene*, **2001**, 20(55): 8009 ~ 8018

- 11 Kiviharju T M , Lecane P S , Sellers R G , Peehl D M. *Clin. Cancer Res.* , **2002** , 8(8) : 2666 ~ 2674
- 12 XU Xiao-Yu , ZHENG Wei-Juan , Hua Zi-Chun. *Chinese Medicinal Biotechnology* , **2009** , 10(4) : 367 ~ 369
徐晓昱, 郑伟娟, 华子春. *中国医药生物技术* , **2009** , 10(4) : 367 ~ 369
- 13 McCallum C , Kwon S , Leavitt P , Shen DM , Liu W , Gurnett A. *Immunobiology* , **2007** , 212(7) : 549 ~ 556
- 14 Leuenroth S J , Crews C M. *Cancer Res.* , **2008** , 68(13) : 5257 ~ 5266
- 15 Leuenroth S J , Crews C M. *Chem. Biol.* , **2005** , 12(12) : 1259 ~ 1268
- 16 Smith G P. *Science* , **1985** , 228(4705) : 1315 ~ 1317
- 17 Goldman I E R , Pazirandeh M P , Charlesb P T , Balighianb E D. *Anal. Chim. Acta* , **2002** , 457(15) : 13 ~ 19
- 18 McGuire M J , Li S , Brown K C. *Methods Mol. Biol.* , **2009** , 504: 291 ~ 321
- 19 TANG Bo , LIU Xiao , XU Xiao-Yu , YAO Qi-Zheng , ZHENG Wei-Juan , HUA Zi-Chun. *J. Southeast Univ. (Med. Sci. Edi.)* , **2008** , 27(6) : 409 ~ 414
唐波, 刘 晓, 徐晓煜, 姚其正, 郑伟娟, 华子春. *东南大学学报(医学版)* , **2008** , 27(6) : 409 ~ 414
- 20 YU De-Quan , ZHANG Dong-Ming , WANG Huai-Bin , LIANG Xiao-Tian. *Acta Pharmaceutica Sinica* , **1992** , 27(11) : 830 ~ 836
于德泉, 张东明, 王淮滨, 梁晓天. *药学学报* , **1992** , 27(11) : 830 ~ 836

Selection of Triptolide Ligands from a Random Phage Display Library and Primary Verification of Their Combination

YANG Xu-Guang¹ , XU Xiao-Yu¹ , LI Jia-Huang¹ , YAO Qi-Zheng² ,

ZHU Tong-Yang¹ , HUA Zi-Chun¹ , ZHENG Wei-Juan^{* 1}

¹(State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology ,

School of Life Science , Nanjing University , Nanjing 210093 , China)

²(School of Pharmacy , China Pharmaceutical University , Nanjing 210009 , China)

Abstract Triptolide is an extract from the Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook f. We screened out a peptide from a C7 phage display library and presumed it was a potential peptide ligand for triptolide. The specificity of the selected clone for triptolide was confirmed by ELISA and immunoprecipitation. After DNA sequencing , a BLAST search was carried out and 77 matching sequences was retrieved. The most promising candidate is human steroidogenic factor-1 (hSF-1) , a member of the nuclear receptor family that controls the synthesis of steroid hormones by regulating steroidogenic enzyme genes. We purified the ligand binding domain (LBD) of hSF-1 and then used it for further experiments. Fluorescence spectrum experiments showed that triptolide could cause fluorescence quenching of hSF-1-LBD , isothermal titration calorimetric(ITC) measurements showed a enthalpy-driven interaction between triptolide and hSF-1-LBD , and a dose-dependent interaction between them was observed by surface plasmon resonance(SPR) . All these results confirmed the specific interaction between hSF-1 and triptolide.

Keywords Triptolide; Human steroidogenic factor-1; Phage display; Fluorescence spectrum; Isothermal titration calorimetry; Surface plasmon resonance

(Received 16 May 2011; accepted 30 September 2011)