

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102617712 A

(43) 申请公布日 2012.08.01

(21) 申请号 201210088960.9

A61P 31/16(2006.01)

(22) 申请日 2012.03.29

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 蒋太交 李春峰 吴爱平

(74) 专利代理机构 北京市汉信律师事务所
11373

代理人 王文生

(51) Int. Cl.

C07K 14/11(2006.01)

C12N 15/44(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

C12N 1/15(2006.01)

C12N 1/19(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61K 39/145(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页

序列表 4 页 附图 3 页

(54) 发明名称

有效抑制流感病毒聚合酶活性的多肽

(57) 摘要

提供了一种用于抑制流感病毒聚合酶活性的多肽,它的氨基酸序列包括流感病毒聚合酶亚基 PB1481-515 位的氨基酸。同时发现在所述多肽的 N 端和 / 或 C 端缺少 5 个或 10 个氨基酸的截短体以及在所述多肽和它的上述截短体的 C 端添加了序列为 YGRKKRRQRRPP 的 13 个氨基酸的衍生多肽也具有类似的对流感病毒聚合酶活性的抑制作用。

1. 一种用于抑制流感病毒聚合酶活性的多肽,它的氨基酸序列包括流感病毒聚合酶亚基 PB1481-515 位的氨基酸片段 (SEQ ID NO :1)。
2. 一种用于抑制流感病毒聚合酶活性的多肽,所述多肽包括 SEQ ID NO :1 的截短体,所述截短体与 SEQ ID NO :1 相比在 N 端和 / 或 C 端缺少 15 个以下的氨基酸,优选地缺少 10 个以下的氨基酸。
3. 根据权利要求 2 的多肽,其中所述截短体与 SEQ ID NO :1 相比在 N 端缺少 10 个或 5 个氨基酸。
4. 根据权利要求 2 的多肽,其中所述截短体与 SEQ ID NO :1 相比在 N 端缺少 10 个氨基酸并且在 C 端缺少 5 个氨基酸。
5. 一种用于抑制流感病毒聚合酶活性的多肽,所述多肽是在根据权利要求 1 至 4 中任一项的多肽的 C 端添加了序列为 YGRKKRRQRRRPP 的 13 个氨基酸的衍生多肽。
6. 核苷酸序列,其编码根据前述权利要求中任一项的多肽。
7. 包括根据权利要求 6 的核苷酸序列的表达载体。
8. 包含根据权利要求 7 的表达载体的细胞。
9. 一种使用根据权利要求 1-5 中任一项的多肽来抑制流感病毒聚合酶活性的方法,所述方法包括将根据权利要求 7 的载体提前转染到之后会被病毒感染的人细胞中。
10. 根据权利要求 1-5 中任一项的多肽、根据权利要求 6 的核苷酸序列、根据权利要求 7 的表达载体或根据权利要求 8 的细胞在制备用于抑制流感病毒聚合酶活性的药物中的应用。

有效抑制流感病毒聚合酶活性的多肽

技术领域

[0001] 本发明涉及生物信息学领域。更具体地,本发明涉及流感病毒 PB1 的模拟结构及针对该结构的有效抑制流感病毒聚合酶活性的多肽。

背景技术

[0002] 流感病毒,属于正粘病毒科,是极易发生突变的负链 RNA 病毒。它是引起流行性感 冒(简称流感)的病原体,在历史上多次引起流行性感 冒大流行:如 1918 年西班牙流感大 流行,造成多达 5000 万人死亡,1957 年流感,引起全球 15 亿人发病。流感病毒的流行为全球的经济和社会发展造成了巨大的危害。所以针对流感病毒的防治是摆在我们面前的一项重要任务。现在使用的有效的流感药物有 Amantadine、Osetamivir、Zanamivir 等,分别针对流感病毒的离子通道蛋白(M2),及表面蛋白(NA)。但是这些小分子药物也存在一些问题,如抗性病毒的出现等(18、24)。所以,我们需要更多的手段来抑制流感病毒的传播。

[0003] 流感病毒的基因组由 8 个基因片段组成,共编码 11 个蛋白。流感病毒聚合酶是由 3 个蛋白(PB2、PB1、PA)组成的异源三聚体复合物,是负责流感病毒复制和转录的重要复合物。PB2 主要负责 Cap binding,PA 主要有核酸内切酶活性,负责切割 5' 端“帽子”结构,而 PB1 是聚合酶的核心蛋白,负责 RNA 链的延伸,单独和 PB2, PA 都有很强的相互作用。另外流感病毒聚合酶在体内要行使功能还需要 NP 蛋白的辅助, NP 蛋白负责结合到病毒的基因组 RNA 上,保持 RNA 的结构稳定性,另外 NP 也能和 PB2 相互作用从而调控转录和复制的过程(9、11、25)。对流感病毒聚合酶的功能研究用的最多的是流感病毒聚合酶的微型复制系统(minireplicon system),即在细胞中表达流感病毒聚合酶行使功能所需要的 4 个蛋白 PB2、PB1、PA 和 NP,另外再表达一个 RNA 报告基因,报告基因反向互补克隆在流感病毒保守的基因组 RNA(vRNA)启动子的 5' 端和 3' 端之间,报告基因最初会被细胞内的 RNA 聚合酶 I 复合物转录出一个 5' 和 3' 端带有流感病毒的启动子的 RNA(报告基因是反向互补的),然后细胞内表达的流感病毒聚合酶会识别该启动子 RNA,从而复制出报告基因为正向克隆的 mRNA,从而在细胞中翻译出报告基因的蛋白产物(22、23)。简单的讲细胞中感染表达 RNA 报告基因的载体后,只要细胞中有足够的流感病毒聚合酶或流感病毒,就能在细胞中检测到报告基因的表达(17、18、22),这也是用来研究针对流感病毒聚合酶的药物很好的系统,当药物能有效抑制流感病毒聚合酶活性的时候,报告基因的表达量就会低,反之会高。

[0004] 在进化上,流感病毒聚合酶结构和功能都非常的保守,针对流感病毒聚合酶的药物相对于针对表面蛋白的药物来讲具有更好的广谱性和耐药性。到现在,PA 的两个亚基结构已被解析,PB2 有近 1/2 的结构被解析,而 PB1 的两端有少部分结构外,还没有更多的 PB1 的结构数据(25)。随着对流感病毒聚合酶结构和功能认识的不断深入,现在流感病毒聚合酶成为人们研制流感药物的新的有效的靶点。

发明内容

[0005] 我们通过对 PB1 结构的模拟,以及通过将诺沃克病毒 (Norwalk virus) RdRp 晶体结构 (PDB ID :3BSN) 中的 RNA 对接 (称为“dock”) 到我们模拟的 PB1 的结构上,发现 PB1 的氨基酸序列中的第 481 位至第 515 位的片段 (下文中称为 PB1 481-515,其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示) 可能参与 PB1 与 RNA 的结合。细胞学实验表明 PB1 481-515 对流感病毒聚合酶具有抑制效果。病毒学实验表明 PB1 481-515 对流感病毒的复制具有很好的抑制效果。并且发现 PB1 481-515 与已报道的对流感病毒聚合酶有抑制效果的片段 PB1n 1-25AA (SEQ ID NO. 2) (18) 在抑制病毒复制方面效果相当。因此,本发明的多肽 PB1 481-515 具有非常好的实用价值和应用前景。

[0006] 更具体地,本发明提供以下各项:

[0007] 1. 一种用于抑制流感病毒聚合酶活性的多肽,它的氨基酸序列包括流感病毒聚合酶亚基 PB1 481-515 位的氨基酸片段 (SEQ ID NO :1)。

[0008] 2. 一种用于抑制流感病毒聚合酶活性的多肽,所述多肽包括 SEQ ID NO :1 的截短体,所述截短体与 SEQ ID NO :1 相比在 N 端和 / 或 C 端缺少 15 个以下的氨基酸,优选地缺少 10 个以下的氨基酸。

[0009] 3. 根据 2 的多肽,其中所述截短体与 SEQ ID NO :1 相比在 N 端缺少 10 个或 5 个氨基酸。

[0010] 4. 根据 2 的多肽,其中所述截短体与 SEQ ID NO :1 相比在 N 端缺少 10 个氨基酸并且在 C 端缺少 5 个氨基酸。

[0011] 5. 一种用于抑制流感病毒聚合酶活性的多肽,所述多肽是在根据 1 至 4 中任一项的多肽的 C 端添加了序列为 YGRKKRRQRRRPP 的 13 个氨基酸的衍生多肽。

[0012] 6. 核苷酸序列,其编码根据前述中任一项的多肽。

[0013] 7. 包括根据 6 的核苷酸序列的表达载体。

[0014] 8. 包含根据 7 的表达载体的细胞。

[0015] 9. 一种使用根据 1-5 中任一项的多肽来抑制流感病毒聚合酶活性的方法,所述方法包括将根据 7 的载体提前转染到之后会被病毒感染的人细胞中。

[0016] 10. 根据 1-5 中任一项的多肽、根据 6 的核苷酸序列、根据 7 的表达载体或根据 8 的细胞在制备用于抑制流感病毒聚合酶活性的药物中的应用。

[0017] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明。

附图说明

[0018] 图 1 是流程框图,其表示模拟构建 PB1 三维结构的流程;

[0019] 图 2 是模拟构建的 PB1 整体结构的示意图;

[0020] 图 3A 显示 PB1 481-515 片段对流感病毒聚合酶的抑制效果;

[0021] 图 3B 显示 PB1 481-515 片段在 N 端和 / 或 C 端缺少 5 个或 10 个氨基酸的截短体对流感病毒聚合酶的抑制效果;

[0022] 图 4A 显示 PB1 481-515 片段对流感病毒 H1N1A/WSN/33 复制的抑制效果;

[0023] 图 4B 显示 PB1 481-515 片段对流感病毒 H9N2A/Quail/HK/G1/97 复制的抑制效果。

[0024] 图 5 显示在 PB1 481-515 的截短体 PB1 491-515 的 C 端添加了序列为

YGRKKRRQRRRPP 的 13 个氨基酸的衍生肽 (491-515-TAT) 在体外对流感病毒聚合酶转录活性的抑制效果

具体实施方式

[0025] 实施例 1、PB1 三维结构的模拟

[0026] 由于 PB1 和已有晶体结构的 RNA dependent RNA polymerase (依赖 RNA 的 RNA 聚合酶, RdRp) 序列的相似性非常低, 很难用已有的常规的基于模板的建模方法来建模 PB1 的结构。在本文中本发明人将已知的 PB1 的功能信息加入常规的基于模板的结构模拟方法 FR-t5 (7) 来找最优的 PB1 的模板。

[0027] 首先挑选用于模拟 PB1 结构的模板, 挑选 PB1 的模板所用的信息包括: PB1 的 111-636 区域为 PB1 的 RdRp 核心区和 PB1 的 5 个保守的基序 (motif) (pre-A、A、B、C、D) 区域 (2、13)。根据设计的方法找到的打分最高的前 20 个蛋白中, 大部分模板是正链 RNA 病毒的 RdRp。打分最高的三个模板从高到低依次为诺沃克病毒 (Norwalk Virus, NV) (6)、手足口病毒 (Foot-and-Mouth Disease Virus, FMDV) (5) 和登革热病毒 (Dengue Virus, DV) (8) 的 RdRps。我们选取排在第一位的 NV RdRp (PDB ID 2B43, 1208-1695AA) 为模板用 Swiss-Model (1) 来构建 PB1 的结构。序列比对时一个原则是优先将 5 个基序的位点对准准确, 另一个原则是尽可能不在模板二级结构中间加入“间隔”, 保持二级结构的完整性。序列和结构比对分析 NV 和 DV 的 RdRp 发现, DV RdRp 多了一个“Flap”结构, 从而使其不能结合双链 RNA (4、10), 而 PB1 和 NV RdRp 都能结合双链 RNA 启动子 (promoter) (3、12、15), 说明 NV RdRp 是非常适合用于构建 PB1 结构的模板。

[0028] 如图 1 所示, PB1 建模的流程包括 4 个步骤: 1) 要模拟区域的选择, 2) 位点限制的折叠识别, 3) 模版的选择和 4) 模板构建优化

[0029] 实施例 2、PB1 481-515 片段的挑选

[0030] 如在图 2A 中所示, 本发明的模拟的 PB1 结构呈现出 RdRp 典型的“闭合的右手”的拓扑结构。该结构的中心是由手指 (fingers) (71-266, 314-405AA), 手掌 (palm) (267-313, 406-501AA) 和拇指 (thumb) (502-600AA) 组成的一个通道, 这个通道是结合 RNA 模板的通道 (RNA template channel)。整个结构中包含 5 个保守的基序。4 个保守位点 D405、G406、D445 和 K481 均位于 RNA 模板的通道周围; 图 2B 是将图 2A 沿纵坐标旋转 180° 得到的图。将已知的诺沃克病毒 RdRp 晶体结构 (PDB ID :3BSN) 中的 RNA 对接 (称为“dock”) 到本发明模拟的 PB1 的结构中, 可以看到在本发明模拟的 PB1 结构的中心形成的 RNA 模板的通道正好可以容纳一个双链的 RNA, 本发明的 PB1 481-515 的位置正好位于所对接的 RNA 周围。

[0031] PB1 的 481 位-515 位氨基酸区域非常保守, 并且包含了基序 E (在负链 RNA 病毒中是非常保守的) (20), 这个片段在如上所述的模拟的含有 RNA 的 PB1 的结构模型中可能参与了 PB1 对 RNA 的结合, 可见这个片段在流感病毒复制过程中功能非常重要, 在体内过表达该片段后, 该片段可能会和 PB1 竞争性结合 RNA, 从而抑制 PB1 的功能及病毒的复制。我们选这个片段进行进一步的检测。

[0032] 实施例 3、将多肽片段 PB1 481-515 构建到真核表达载体上

[0033] 用定点突变的方法将获得自 He, W 等的载体 pcDNA3.1-6HA (14) 中的 NdeI 酶切位点突变掉, 引物为 NdeI-F :CATCAAGTGTATCGTATGCCAAGTAC ; NdeI-R :

CGTACTTGGCATAACGATACTTGTATG。测序正确后记为 pcDNA3.1-6HA-M, 设计引物 :Flag-F :C
CCAAGCTTCATATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGGATCCGTGAGCAAGGGCGAGGAG ;Flag-R :CCGGA
ATTCCCCGGGACTACTTGTACAGCTCGTCCATGC, 将 Flag-GFP 从模板 pEGFP-N1 (购自 clontech)
中扩增出来, 用 HindIII、EcoRI 酶切所得到的 PCR 产物并回收, 将该切好的 PCR 产物连
接到用 HindIII、EcoRI (Takara 公司生产) 酶切并回收的载体 pcDNA3.1-6HA-M 上, 得到
pFA-Flag-GFP, 其中 Flag 两边带有 NdeI、BamHI 的酶切位点 (下划线表示), 测序正确后,
用于之后的载体构建。

[0034] 设计特异引物 (481-F :CCATTATGGCCCCATATGCCCAAGTCTTACATAAATCGGACAGGAAC ;
481-R :CGACATGTTTTTGGATCCCCCTAGGATCCAGACTCCAAAGCTGGCA) 将 PB1 481-515 从模
板 pBD-PB1 (来自于 1996 年在广东的鹅体内分离的 A 型高致病性禽流感 H5N1 的基因, 毒株
名称为 :A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) (8,19)) 中扩增出来, 用 NdeI、BamHI (Takara 公司
生产) 双酶切所得的 PCR 产物和载体 pFA-Flag-GFP, 用 T4 连接酶 (Takara 公司生产) 进
行连接, 转化到 TOP10 感受态细胞 (购自北京 GenStar 公司) 中, 测序鉴定正确并在本文中
记为 pFA-PB1481-515-GFP, 即将 pFA-Flag-GFP 载体中的 Flag 片段替换为 PB1 481-515 片
段。其他片段的克隆都采用同样的策略。下文中除非另外说明, 就用 pFA-peptide-GFP 表
示表达多种肽 (peptide) 与 GFP 相连的融合蛋白 (peptide-GFP) 的载体。

[0035] 实施例 4、将多肽片段 PB1 481-515 的截短体构建到真核表达载体上

[0036] PB1 481-515 截短体是在 PB1 481-515 的 N 端和 C 端截去若干个 (例如 5 个或 10
个) 氨基酸的不同截短体。将所述截短体构建到实施例 3 中所述的真核表达载体上, 所用
方法与实施例 3 中所述基本相同, 不同之处在于当从模板扩增目的片段时, 使用以下表 1 中
的引物以获得相应的截短体克隆。

[0037] 表 1PB1 481-515 的不同截短体的构建

[0038]

截短体	SEQ ID NO	质粒名称	正向引物	反向引物
PB1 486-515	SEQ ID NO. 3	pFA-486-515-GFP	GGAATTCCATA TGCGGACAGG AACATTTGAAT TCAC	CGACATGTTTTTGGGA TCCCCCTAGGATCCA GACTCTCCAAAGCTG GGCA
PB1 491-515	SEQ ID NO. 4	pFA-491-515-GFP	GGAATTCCATA TGGAATTCACA AGCTTCTCTA	CGACATGTTTTTGGGA TCCCCCTAGGATCCA GACTCTCCAAAGCTG

[0039]

			CCGC	GGCA
PB1 491-510	SEQ ID NO. 5	pFA-491-510-GFP	GGAATTCCATA TGGAATTCACA AGCTTCTTCTA CCGC	CGCGGATCCGGGCAG CTCCATACTGAAGTT

[0040] 实施例 5、PB1 481-515 在 293T 细胞内对流感病毒 WSN33 聚合酶的抑制效果

[0041] 转染的前一天铺 HEK293T 细胞 (ATCC :CRL-11268) 于 6 孔板 (购自 Corning 公司);待细胞长至 60% -80% 密度时转染;每孔所需质粒 pcDNA-PB2、pcDNA-PB1、pcDNA-PA 为 90ng, pcDNA-NP 为 300ng, 分别用于表达病毒 A/WSN/33 的蛋白 PB2、PB1、PA 和 NP, 这是流感病毒聚合酶在体内行使功能必需的 4 个蛋白, 这 4 种质粒的来源请参见参考文献 (12); pPoII-NP-Luc 为 50ng, 构建载体时将 firefly luciferase 的基因反向互补克隆在 A 型流感病毒保守的启动子 5' 和 3' 端中间, 用于检测流感病毒聚合酶的活性, 流感病毒聚合酶活性高, 则 firefly luciferase 的活性就高, 反之亦然 (该质粒的来源参见文献 18); pRenilla (购自 Promega) 为 100ng, 转染后直接表达 Renilla luciferase, 转染效率的高低直接体现在 Renilla luciferase 的活性高低上, 用于归一化转染效率 (firefly luciferase 的信号除以 renilla luciferase 的信号); 以及 900ng 本发明中构建的多种质粒 pFA-peptide-GFP, 用于表达 peptide-GFP 的融合蛋白; 具体过程如下:

[0042] 1) 转染时, 先在 EP 管中准备 PEI (polyethyleneimine 简写, 购自 Sigma 公司) 混合物, 按照质粒: PEI = 1 : 2 (质量体积比) 转染, 将 PEI 加到 100ul opti MEM (Gibicol) 中, 震荡混匀, 3000rpm 离心 30 秒 (离心机型号 Centrifuge 5424, 购自 Eppendorf 公司), 室温放置 5min;

[0043] 2) 取另一 EP 管准备 DNA 混合物, 将上述 7 种质粒混在一起, 加入 100ul opti-MEM 中, 震荡混匀, 3000rpm 离心 30 秒, 即为 DNA 混合物;

[0044] 3) PEI 混合物放置 5min 后, 将 PEI 混合物逐滴加入到 DNA 混合物中, 震荡混匀, 3000rpm 离心 30 秒, 室温放置 25min;

[0045] 4) 25min 后, 将第 3 步的混合物均匀滴加到有 293T 细胞的 6 孔板中, 放入细胞培养箱, 培养 24 小时后, 裂解细胞进行检测。阴性对照与实验组的区别在于用 pcDNA3.1-6HA 代替 pcDNA-PB2。

[0046] 转染 24h 后检测 firefly 和 Renilla luciferase 的活性 (用 promega 的 dual luciferase assay 试剂盒), 具体做法是: 先去培养基, 用 1ml PBS/孔洗细胞一次, 去掉 PBS; 用 300ul PLB 裂解液裂解细胞, 放室温 2-3min, 然后反复吹打, 收集所有的细胞裂解液; 再放至 -80°C 冻融一次; 放冰上溶解后, 12000rpm 离心 1min, 取 30ul 上清用 GENiosPlus 酶标仪 (购自 Tecan 公司) 检测 firefly 和 renilla luciferase 信号, 检测的 buffer 各用 50ul 即可; 将 Flag-GFP 一组的归一化后的 firefly luciferase 活性值设为 100%, 其他组的和其比较, 值越低, 说明多肽对流感病毒聚合酶活性的抑制效果越好; 值越高, 说明多肽对流感病毒聚合酶活性的抑制效果越差。

[0047] 结果如图 3A 显示, 不转染 PB2 表达载体的组, 活性很低, 为 Flag-GFP 组的 0.1% 左右, 阳性对照 PB1n1-25AA 对流感病毒聚合酶活性能抑制 80% 左右, PB1 481-515 也能很好

的抑制流感病毒聚合酶的活性,抑制效果也接近 80%。

[0048] 如图 3B 所示,N 端缺少 10 个或 5 个氨基酸的截短体 PB1 491-515 或 PB1 486-515 以及 N 端缺少 10 个氨基酸并且 C 端缺少 5 个氨基酸的截短体 PB1 491-510 的抑制效果也很好。

[0049] 对同样样品,通过蛋白质印迹法 (Western Blotting) 检测 GFP 融合蛋白的表达量:取 16ul 跑 SDS-PAGE,小鼠 GFP 一抗 (购自 Santa) 稀释比例为 1 : 1000,用于检测 peptide-GFP 融合蛋白的量,并用 GAPDH 的抗体 (购自上海康成) 检测内参蛋白 GAPDH 的量,一抗均用含 5%脱脂奶粉的 PBS 稀释,稀释比例为 1 : 10000,羊抗鼠二抗 (购自中杉金桥) 用含 5%脱脂奶粉的 PBS 稀释,稀释比例为 1 : 4000。结果在内参蛋白 GAPDH 表达量一致时,Flag-GFP 融合蛋白的表达量最高 (结果未显示),这也说明有抑制效果的片段并不是由于表达量高引起的。

[0050] 实施例 6、PB1 481-515 在人肺癌细胞 A549 中对流感病毒复制的抑制效果

[0051] A549 细胞 (ATCC, CCL-185),培养在 24 孔板 (购自 Corning 公司),长至 60% 满度,PEI 转染 (pFA-peptide-GFP 和 pPolI-Gluc-Infection(17) 分别 0.45ug、0.35ug), pFA-peptide-GFP 用来表达 peptide-GFP 融合蛋白, pPolI-Gluc-Infection 用于检测病毒的多少,原理和 pPolI-NP-Luc 一样,区别在于报告基因不是 firefly luciferase,而是 Gaussia luciferase。当该载体转染 A549 细胞后,细胞中只要存在 A 型流感病毒,细胞就会分泌 Gaussia luciferase 到培养基中,细胞中病毒越多,培养基中的 luciferase 信号会越强,反之亦然 (17),可以用这个方法检测多肽对病毒是否具有抑制效果。转染 12h 后 (90-100% 满度),去细胞培养基;用 PBS 洗 2 遍;用 1ml 病毒感染液感染细胞 (感染复数 Multiplicity of infection 为 0.01-0.03, WSN33 的全称为 A/WSN/33,最初是 1933 年在 Wisconsin 分离到的 A 型 H1N1 病毒。H9N2 的全称为 A/Quail/HK/G1/97,是 1997 年在香港的鹌鹑体内分离的 A 型流感病毒),37°C,2h;去上清,用 PBS 洗 2 遍;加入病毒感染液 2ml;对照为不感染病毒的组 (Mock)。

[0052] 感染 12 小时后检测细胞的 Luciferase 活性:取上清 60ul,8000rpm,2min,取上清,放于 -20°C 冻融一次后检测;将测得的转染 Flag-GFP 融合蛋白组的 Luciferase 活性值减掉不感染病毒的组的 luciferase 活性值后设为 100%,测得的其他组的 Luciferase 活性值同样减掉不感染病毒的组的 luciferase 值后,和 Flag-GFP 组作对比,得到相对活性值,相对活性值越低,说明多肽对流感病毒复制的抑制效果越好;相对活性值越高,说明多肽对流感病毒复制的抑制效果越差。结果如图 4A 和 4B 所示,阳性对照 PB1 1-25AA 能有效的抑制流感病毒 A/WSN/33 和 A/Quail/HK/G1/97 的复制,抑制效果在 80% 以上, PB1 481-515 也能很好的抑制上述两种流感病毒的复制,抑制效果在 80% 左右。

[0053] 实施例 7、检测合成的多肽 PB1 491-515-TAT 在体外对流感病毒聚合酶转录活性的抑制效果

[0054] 用 TAP pull down 的方法制备流感病毒聚合酶复合物,即将流感病毒聚合酶 3 个亚基 PA, PB1, PB2 从细胞中纯化出来 (27)。首先,35mm 细胞培养皿 (购自 Corning 公司) 中培养 HEK293T 细胞 (ATCC :CRL-11268) 至 90% 满度,每皿细胞中转染 pcDNA-PB1, pcDNA-PB2, pcDNA-PA-TAP 各 1.7ug,分别用来表达流感病毒聚合酶的 PB1, PB2, PA 亚基,其中 PA 蛋白的 C 端带有 TAP 标签,TAP 标签从 N 端到 C 端依次为钙调蛋白结合区域,TEV 蛋白

酶切位点及两个蛋白酶 A 结构域。转染后培养 48 小时,用预冷的 PBS 洗细胞两次,用胰酶消化后离心收细胞,冰上裂解细胞 30min(裂解液含 10mM HEPES、200mM NaCl、25%甘油、0.5% NP-40、1mM beta-巯基乙醇、0.1mM PMSF,按照 1 片蛋白酶抑制剂配 10mL 裂解液的比例加入蛋白酶抑制剂(Protease Inhibitor Cocktail Tablet,购自 Roch 公司)。先用 IgG 偶联的基质(购自 GE 公司)和细胞裂解液 4 度孵育过夜;然后用 TEV 蛋白酶将流感病毒聚合酶从 IgG 基质上切下来,使用前放于 -20°C 保存。

[0055] 配制 2.5ul ApG 作为引物的体外转录(ApG primed transcription)体系(26),该体系包括 1.5ul 流感病毒聚合酶复合物、5mM MgCl₂、1mM DTT、1mM ApG(购自 Sigma 公司)、4U Rnasin(购自 Fermentas 公司)、1mM ATP、0.5mM CTP、0.15uM alpha-³²P GTP(3000ci/mmol 购自北京福瑞公司)、4pmol 3' 端 vRNA(5' -GGCCUGCUUUUGCU-3')、4pmol 5' 端 vRNA(5' -AGUAGAAACAAGGCC-3'),vRNA 由上海吉玛公司合成。转录体系中再加入 0.5ul 合成的 PB1 491-515-TAT 片段(见下面),转录时在 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 小时。转录时,流感病毒聚合酶会以 vRNA 作为模板,用 ApG 作为引物进行转录,转录时 alpha-³²P GTP 会掺入到新合成的 RNA 上,得到 14nt 大小的掺有 alpha-³²P GTP 转录产物,可以用同位素信号的强弱来衡量转录活性的高低。如果多肽对聚合酶活性有抑制效果,那么和对照相比,转录产物的信号会低。反应结束后,加入 10ul 含有 1mM EDTA,及溴酚蓝和二甲苯青的 80%的甲酰胺,95 $^{\circ}\text{C}$ 处理 3min 终止反应。用含 7M 尿素的丙烯酰胺浓度为 16%的凝胶电泳,用放射性自显影的方法检测转录产物的多少,用到的胶片购自柯达公司(BioMax MS Film)。

[0056] 将 PB1 491-515 区域(PB1 481-515N 端去掉 10 个氨基酸的截短体)的 C 端加入 13 个氨基酸(这 13 个氨基酸是 HIV TAT 蛋白的一段蛋白序列,能协助多肽进入细胞膜,下文中称为 TAT,序列参见 SEQ ID NO. 6)(18),这个衍生多肽记为 491-515-TAT(SEQ ID NO. 7)。由公司进行多肽合成(由上海强耀公司合成),阴性对照多肽为 PX-TAT(SEQ ID NO. 8)(18),PX 为博尔纳病病毒的磷蛋白的 69-93 区域,合成的两个多肽的水溶性很好,每管 1mg 的样品用 ddH₂O 溶解成 600uM 浓度后,再将其稀释 10 倍,取 0.5ul 加入到 2.5ul ApG 作为引物的体外转录体系中,检测肽的终浓度分为 100uM,10uM 时对 RdRp 体外转录活性的影响。

[0057] 结果见图 5。合成的肽 491-515-TAT 在浓度为 100uM 时在体外对流感病毒聚合酶具有很好的抑制效果。而对照多肽 PX-TAT 则对聚合酶几乎没有抑制效果。作为另一个对照,体系中加入 0.5ul 水对聚合酶的活性也没有影响。

[0058] 参考文献

[0059] 1. Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp, and T. Schwede. 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22:195-201.

[0060] 2. Biswas, S. K., and D. P. Nayak. 1994. Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J Virol* 68:1819-26.

[0061] 3. Ferrer-Orta, C., A. Arias, C. Escarmis, and N. Verdaguer. 2006. A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol* 16:27-34.

[0062] 4 Zhong W, Ferrari E, Lesburg CA, Maag D, Ghosh SK, et al. (2000) Template/primer requirements and single nucleotide incorporation by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *J Virol* 74:9134-9143.

- [0063] 5. Hogbom, M. , K. Jager, I. Robel, T. Unge, and J. Rohayem. 2009. The active form of the norovirus RNA-dependent RNA polymerase is a homodimer with cooperative activity. *J Gen Virol* 90 :281-91.
- [0064] 6. Ferrer-Orta, C. , A. Arias, R. Perez-Luque, C. Escarmis, E. Domingo, and N. Verdaguer. 2004. Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J Biol Chem* 279 :47212-21.
- [0065] 7. Hu, Y. , X. Dong, A. Wu, Y. Cao, L. Tian, and T. Jiang. 2011. Incorporation of local structural preference potential improves fold recognition. *PLoS One* 6 :e17215.
- [0066] 8. Yap, T. L. , T. Xu, Y. L. Chen, H. Malet, M. P. Egloff, B. Canard, S. G. Vasudevan, and J. Lescar. 2007. Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. *J Virol* 81 :4753-65.
- [0067] 9. He, X. , J. Zhou, M. Bartlam, R. Zhang, J. Ma, Z. Lou, X. Li, J. Li, A. Joacniamiak, Z. Zeng, R. Ge, Z. Rao, and Y. Liu. 2008. Crystal structure of the polymerase PA(C)-PB1(N) complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature* 454 :1123-6.
- [0068] 10. Hong, Z. , C. E. Cameron, M. P. Walker, C. Castro, N. Yao, J. Y. Lau, and W. Zhong. 2001. A novel mechanism to ensure terminal initiation by hepatitis C virus NS5B polymerase. *Virology* 285 :6-11.
- [0069] 11. Poole, E. L. , L. Medcalf, D. Elton, and P. Digard. 2007. Evidence that the C-terminal PB2-binding region of the influenza A virus PB1 protein is a discrete alpha-helical domain. *FEBS Lett* 581 :5300-6.
- [0070] 12. Deng, T. , J. Sharps, E. Fodor, and G. G. Brownlee. 2005. In vitro assembly of PB2 with a PB1-PA dimer supports a new model of assembly of influenza A virus polymerase subunits into a functional trimeric complex. *J Virol* 79 :8669-74.
- [0071] 13. Jung, T. E. , and G. G. Brownlee. 2006. A new promoter-binding site in the PB1 subunit of the influenza A virus polymerase. *J Gen Virol* 87 :679-88.
- [0072] 14. He, W. , X. Ma, X. Yang, Y. Zhao, J. Qiu, and H. Hang. 2011. A role for the arginine methylation of Rad9 in checkpoint control and cellular sensitivity to DNA damage. *Nucleic Acids Res* 39 :4719-27.
- [0073] 15. Perez, M. , and J. C. de la Torre. 2003. Characterization of the genomic promoter of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 77 :1184-94.
- [0074] 16. Obayashi, E. , Yoshida, H. , Kawai, F. , Shibayama, N. , Kawaguchi, A. , Nagata, K. , Tame, J. R. , and Park, S. Y. (2008). The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature* 454, 1127-1131.
- [0075] 17. Zhu, W. , J. Zhou, K. Qin, N. Du, L. Liu, Z. Yu, Y. Zhu, W. Tian, X. Wu, and Y. Shu. 2011. A reporter system for assaying influenza virus RNP functionality based on secreted Gaussia luciferase activity. *Virol J* 8 :29.
- [0076] 18. Ghanem, A. , D. Mayer, G. Chase, W. Tegge, R. Frank, G. Kochs, A. Garcia-Sastre,

and M. Schwemmler. 2007. Peptide-mediated interference with influenza A virus polymerase. *J Virol* 81:7801-4.

[0077] 19. 李泽君, 焦培荣, 于康震, 陈化兰. 2005, H5N1 亚型高致病性禽流感病毒 A/goose/Guangdong/1/96 株反向基因操作系统的建立. *中国农业科学* 2005, 38(8): 1686-1690

[0078] 20. Muller, R., O. Poch, M. Delarue, D. H. Bishop, and M. Bouloy. 1994. Rift Valley fever virus L segment: correction of the sequence and possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. *J Gen Virol* 75(Pt 6):1345-52.

[0079] 21. Nath, S. T., and D. P. Nayak. 1990. Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 influenza virus (H1N1). *Mol Cell Biol* 10:4139-45.

[0080] 22. Fodor, E., Devenish, L., Engelhardt, O. G., Palese, P., Brownlee, G. G., and Garcia-Sastre, A. (1999). Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J Virol* 73, 9679-9682.

[0081] 23. 刘大飞, 刘春国, 刘明, 刘大程. 流感病毒反向遗传学技术研究进展. *生物化学与生物物理进展* 2008 年 35 卷 8 期.

[0082] 24. Su CY, Cheng TJ, Lin MI, Wang SY, Huang WI, et al. (2010) High-throughput identification of compounds targeting influenza RNA-dependent RNA polymerase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:19151-19156.

[0083] 25. Ruigrok RW, Crepin T, Hart DJ, Cusack S (2010) Towards an atomic resolution understanding of the influenza virus replication machinery. *Curr Opin Struct Biol* 20:104-113.

[0084] 26. Fodor, E., Crow, M., Mingay, L. J., Deng, T., Sharps, J., Fechter, P., and Brownlee, G. G. (2002). A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. *J Virol* 76, 8989-9001.

[0085] 27. Deng, T., Sharps, J., Fodor, E., and Brownlee, G. G. (2005). In vitro assembly of PB2 with a PB1-PA dimer supports a new model of assembly of influenza A virus polymerase subunits into a functional trimeric complex. *J Virol* 79, 8669-8674.

[0001]

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 有效抑制流感病毒聚合酶活性的多肽

<130> IB120081

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Lys Ser Tyr Ile Asn Arg Thr Gly Thr Phe Glu Phe Thr Ser Phe Phe
 1 5 10 15

Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro Ser Phe
 20 25 30

Gly Val Ser
 35

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

[0002]

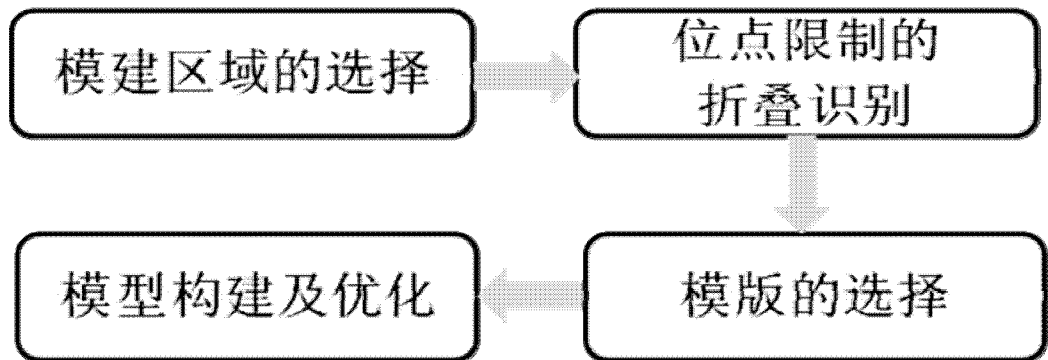


图 1

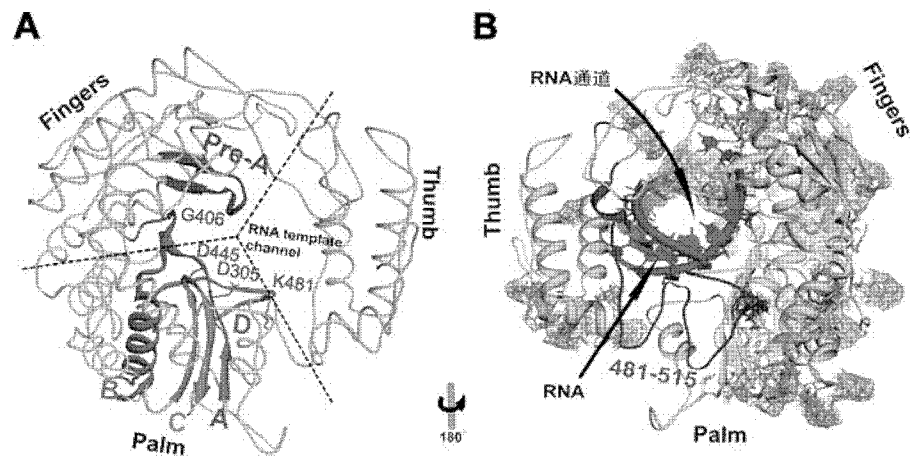


图 2

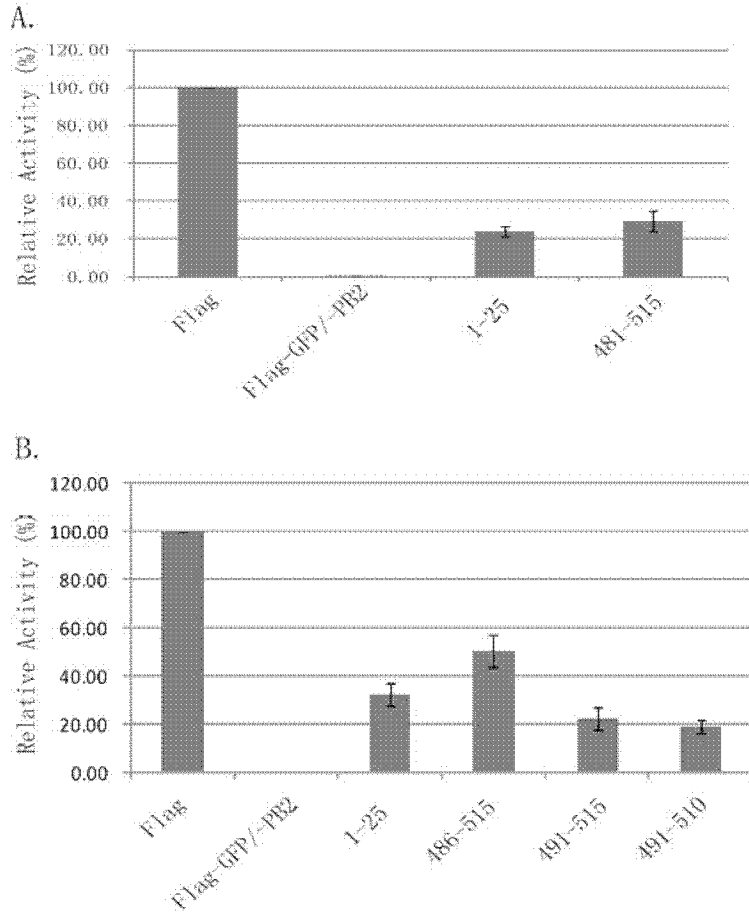


图 3

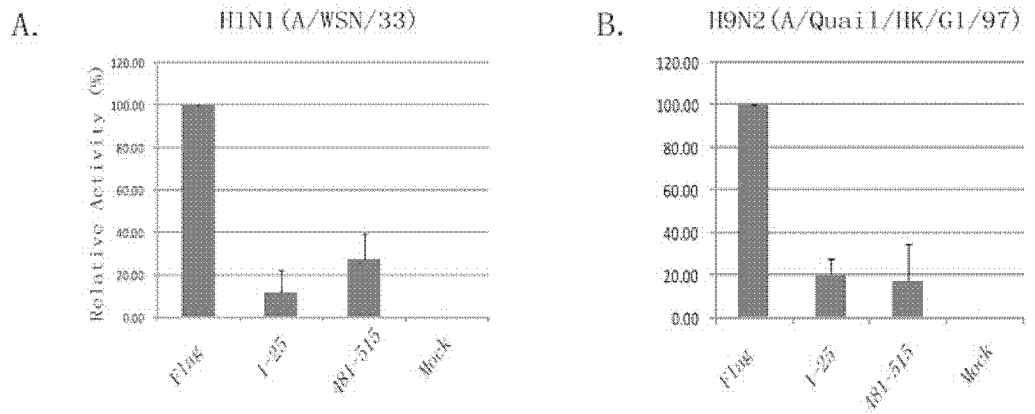


图 4

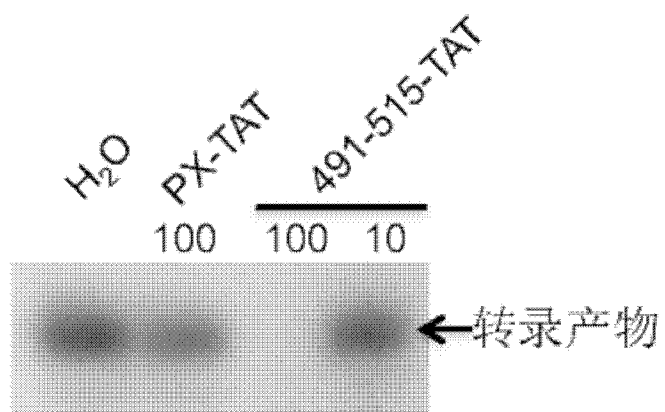


图 5