

(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 102690335 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 26

---

(21) 申请号 201210158011. 3

(22) 申请日 2012. 05. 21

(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 张红

(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 5/10* (2006. 01)

*A61K 38/16* (2006. 01)

*A61K 48/00* (2006. 01)

*A61P 31/16* (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页

序列表 2 页 附图 1 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 PB1 731-757 位的氨基酸。

1. 一种用于抑制流感病毒聚合酶活性的多肽,它的氨基酸序列包含流感病毒聚合酶亚基 PB1 731-757 位的氨基酸 (SEQ ID NO :1)。
2. 核苷酸序列,其编码根据权利要求 1 所述的多肽。
3. 包含根据权利要求 2 所述的核苷酸序列的表达载体。
4. 包含根据权利要求 3 所述的表达载体的细胞。
5. 一种使用根据权利要求 1 所述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 3 所述的载体提前转染到之后会被病毒感染的人细胞中。
6. 根据权利要求 1 所述的多肽、根据权利要求 2 所述的核苷酸序列、根据权利要求 3 所述的表达载体或根据权利要求 4 所述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] 本发明涉及能够有效抑制流感病毒聚合酶活性的多肽。

### 背景技术

[0002] 流感病毒每年都能造成大量的人员的死亡,最近发生的 H1N1 的全球流行对人类社会的生命及经济财产造成了很大的损失,所以有效的抑制流感病毒的传播对促进和保护人类的文明意义重大。现在使用的有效的流感药物有 Amantadine(金刚烷胺)、Oseltamivir(奥司他韦)、Zanamivir(扎那米韦)等,分别针对流感病毒的离子通道蛋白(M2),及表面蛋白(NA)(2)。但是这些小分子药物也存在一些问题,如抗性病毒的出现。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(1,16,19)。病毒侵染细胞后,会利用宿主细胞的蛋白合成系统来合成自身的蛋白,包括新合成的 PB2、PB1 及 PA 蛋白。新合成的蛋白 PB1 和 PA 在细胞质内组装成二聚体,再在核内和 PB2 组装成具有完整功能的三聚体来行使转录和复制的功能(4)。流感病毒聚合酶在体内行使功能还需要 NP 蛋白的参与,NP 主要参与 RNA 的结合,及与 PB2、宿主因子的相互作用(12,13,16)。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(2,6,17,20)。PA 和 PB1 的组装主要是由 PA 的 C 端和 PB1 的 N 端的 1-25 位氨基酸(下文中称为 PB1<sub>1-25</sub>,本文中对流感病毒聚合酶亚基的片段采用于此相似的命名方式)来参与的,该复合物的晶体结构已被解析(9,14);而 PB1 和 PB2 的组装主要是由 PB1 的 676-757 位氨基酸(下文中称为 PB1c)和 PB2 的 1-40 位氨基酸(下文中称为 PB2n)来介导的,并有相关的晶体结构解析出来(15,18);上述两个复合物的晶体结构都是非常好的多肽或小分子药物的靶标。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(6,20)。

[0004] 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(5)。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(5,6,22),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。

[0005] 之前的研究发现 PB1<sub>1-25</sub> 能有效的抑制流感病毒的复制。该片段主要是通过阻断 PA 和 PB1 的组装来抑制流感病毒聚合酶的活性从而抑制了流感病毒的复制,这个片段及其

应用已经申请专利(专利号:PCT/EP2009/055632)(20)。由此也已看出,多肽药物在流感病毒的防治尤其是高致病性流感病毒的防治领域具有广阔的应用前景。

### 发明内容

[0006] 基于对 PB1 和 PB2 组装过程的认识,即 PB1 和 PB2 的组装主要是由 PB1c 和 PB2n 来介导的,并参考 PB1c 与 PB2n 的复合物的晶体结构(PDBID 2ZTT),我们推测 PB1 的 C 端的 731-757 位氨基酸(下文中称为 PB1<sub>731-757</sub>,其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示)可能参与 PB1 和 PB2 组装。细胞学实验表明 PB1<sub>731-757</sub> 对流感病毒聚合酶的活性具有很好的抑制效果。病毒学实验表明 PB1<sub>731-757</sub> 对流感病毒的复制具有很好的抑制效果。并且发现 PB1<sub>731-757</sub> 与已报道的对流感病毒聚合酶有抑制效果的片段 PB1<sub>1-25</sub>(其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示)在抑制病毒复制方面效果相当。因此,本发明的多肽 PB1<sub>731-757</sub> 作为一种能够有效抑制流感病毒的多肽药物具有非常好的实用价值和应用前景。

[0007] 更具体地,本发明提供以下各项:

[0008] 1. 一种用于抑制流感病毒聚合酶活性的多肽,它的氨基酸序列包含流感病毒聚合酶亚基 PB1 731-757 位的氨基酸(SEQ ID NO :1)。

[0009] 2. 核苷酸序列,其编码根据 1 的多肽。

[0010] 3. 包含根据 2 的核苷酸序列的表达载体。

[0011] 4. 包含根据 3 的表达载体的细胞。

[0012] 5. 一种使用根据 1 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 3 的载体提前转染到之后会被病毒感染的人细胞中。

[0013] 6. 根据 1 的多肽、根据 2 的核苷酸序列、根据 3 的表达载体或根据 4 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。

[0014] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明。

### 附图说明

[0015] 图 1. PB1<sub>731-757</sub> 的相互作用对象及强度;

[0016] 图 2. 多肽片段 PB1<sub>731-757</sub> 对流感病毒 WSN33 聚合酶活性的抑制效果(图 2A)以及对病毒 WSN33 复制的抑制效果(图 2B)。

### 具体实施方式

[0017] 实施例 1、片段 PB1<sub>731-757</sub> 的选择

[0018] 依据 PB1c 和 PB2n 的晶体结构(PDB ID 2ZTT)(18)可以看出 PB1c 的第 3 个  $\alpha$  螺旋与 PB1c 的第 2 个  $\alpha$  螺旋和 PB2n 都非常靠近,很多残基的侧链有直接的相互作用。现有文献中未曾提及 PB1c 的第 3 个  $\alpha$  螺旋是否能单独直接参与和 PB1c 或 PB2n 的相互作用,以及这个区域在 PB1c 和 PB2n 的组装中有什么功能也不清楚。我们认为 PB1c 的第 3 个  $\alpha$  螺旋可能与 PB1c 的第 2 个  $\alpha$  螺旋或 PB2n 能相互作用。因此我们选取 PB1c 上第 3 个  $\alpha$  螺旋(PB1<sub>736-755</sub>)并在 N 端和 C 端各延长了 5 个和 2 个氨基酸,以保持  $\alpha$  螺旋结构的稳定性,即以 PB1<sub>731-757</sub> 作为检测对象,看该片段能否和 PB1c 或 PB2n 相互作用,及在体内过表达后看能否抑制流感病毒聚合酶的活性。

[0019] 实施例 2、检测 PB1<sub>731-757</sub> 与 PB1c 或 PB2n 的相互作用

[0020] 用 BiFc (双分子荧光互补测定) 的方法检测 PB1<sub>731-757</sub> 与 PB1c 或 PB2n 的相互作用。

[0021] BiFc 的原理为:将荧光蛋白在某些特定的位点切开,形成不发荧光的 N 和 C 端 2 个多肽,称为 N 片段 (N-fragment) 和 C 片段 (C-fragment)。这 2 个片段在细胞内共表达或体外混合时,不能自发地组装成完整的荧光蛋白,在该荧光蛋白的激发光激发时不能产生荧光。但是,当这 2 个荧光蛋白的片段分别连接到 1 组有相互作用的目标蛋白上,在细胞内共表达或体外混合这 2 个融合蛋白时,由于目标蛋白质的相互作用,荧光蛋白的 2 个片段在空间上互相靠近互补,重新构建成完整的具有活性的荧光蛋白分子,并在该荧光蛋白的激发光激发下,发射荧光。简言之,如果目标蛋白质之间有相互作用,则在激发光的激发下,产生该荧光蛋白的荧光。反之,若蛋白质之间没有相互作用,则不能被激发产生相应的荧光蛋白的荧光 (10, 11, 21)。

[0022] 在本实验中,我们将 YFP 蛋白 (黄色荧光蛋白) 在 154 位点处分割为 N 端 (1-154) 和 C 端 (155-238),克隆到载体 pBiFC1 和 pBiFc3 上 (21),引物如下表 1,所构建的载体分别记为 pYF-YN155 和 pYF-YC155,该质粒表达的片段分别简记为 YN 和 YC;设计引物 (见表 1),将编码 PB1<sub>731-757</sub> 的核酸序列 (SEQ ID NO. 3)、编码 PB1c 和 PB2n 的核酸序列分别从模板 pBD-PB1 和 pBD-PB2 (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),关于质粒的来源参见文献 (9) 和 (18)) 中扩增出来,将 PB1c 和 PB2n 分别克隆到 pYF-YN155 上编码 YN 片段的核酸序列的下游,表达的融合蛋白分别记为 YN-PB1c 和 YN-PB2n,将 PB1<sub>731-757</sub> 构建在 pYF-YC155 上编码 YC 片段的核酸序列的下游,表达的融合蛋白记为 YC-PB1<sub>731-757</sub>,引物见表 1;载体的启动子为 GalI 启动子,该启动子在有半乳糖诱导时会使下游基因表达,而在含有棉子糖的培养基中下游基因不会表达。

[0023] 表 1 分子生物学实验所用酶切位点和引物

[0024]

要扩增的片段	所用的酶切位点	正向引物	反向引物
YN155	HindIII, SalI	CCCAAGCTT GCTAGCATGGTGAG CAAGGGCGAG	GCGTCGACAGCGTAATCTGGTACGTCGTA TGGGTAGGATCCAGATCTGAATTCCATAT GACCAGAACCAGAACCACCGGCCATGAT ATAGACGTTGT
YC155	HindIII, SalI	CCCAAGCTT ATG GACAAGCAGAAGAA CGGCA	GCGTCGACCAGGTCTCCTCTGAGATCA GCTTCTGCTCGGATCCAGATCTCATATGA CCAGAACCAGAACCACCCTTGACAGCT CGTCCATGCCG
PB1 <sub>731-757</sub>	NdeI,  BamHI	CCATTATGGCCCCAT ATGCCCGAGTCTGG AAGGATTAAGAAAG AAG	CGACATGTTTTTTGGATCCCCCCTAGGAT CCTTTTTGCCGTCTGAGCTCTT
PB1c	NdeI,  BamHI	CCATTATGGCCCCAT ATGCCCAACACCAG CCAAGGGGGATT	CGACATGTTTTTTGGATCCCCCCTAGGAT CCTTTTTGCCGTCTGAGCTCTT
PB2n	EcoRI, BamHI	GCGTCGAC GAATTCATGGAGAG AATAAAAGAATTAA GAG	CGACATGTTTTTTGGATCCCCCCTAGGAT CCCTCTTGCTCTCCTGATGTGTATTTC

[0025] 构建好载体后,用 PEG/LiAc 法 (7,21) 将其转化到酵母 ySC8 (基因型为 :MAT  $\alpha$ , ade2-1ura3-1his3-11,15trp1-1leu2-3,112can1-100lys2::hisGbar1::hisGpep4::kan M) (3) 中,将经转化的酵母涂于 2 缺固体培养基 (每 100ml 培养基含有 :0.17g 酵母氮源 (YNB)、0.5g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、2g 葡萄糖、2g 琼脂、0.065g 除亮氨酸、色氨酸外的 16 种必需氨基酸粉末,均购自北京鼎国公司) 的固体平板上。涂好平板后放于 30°C 的培养箱中培养 2 天,之后将平板上长出的菌挑取并转入到液体的 2 缺培养基中 (每 100ml 培养基含有 :0.17g 酵母氮源 (YNB)、0.5g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、2g 棉子糖、0.065g 除亮氨酸、色氨酸外的 16 种必需氨基酸粉末),30°C 培养 40 小时。去培养基,换成诱导培养基 (每 100ml 培养基含有 :0.17g 无氨基酵母氮源 (YNB)、0.5g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、2g 棉子糖、4g 半乳糖、0.065g 除亮氨酸、色氨酸外的 16 种必需氨基酸粉末),于 20°C 培养 40 小时,去培养基,加入 100ul 磷酸盐缓冲液 (PBS),用酶标仪来检测 (购自 Tecan, 型号为 GENios) YFP 信号和 OD600,所测得的 YFP 的值 OD600 的值进行归一化,得到相对荧光值 (YFP/OD600)。如果检测组的相对荧光值比两个对照组都显著的要高 (学生 t 检验, p 值 < 0.05), 就认为相互作用为阳性,反之为阴性 (21)。

[0026] 为检测 PB1<sub>731-757</sub> 与 PB2n 的相互作用,将对应的表达 YC-PB1<sub>731-757</sub> 和 YN-PB2n 的两个质粒同时转到酵母菌株 ySC8 中以作为检测组 (图 1A 中的 YN-PB2n+YC-PB1<sub>731-757</sub>, “+”表示用表达两个片段的质粒共转化酵母),同时制备两个对照组 :YN-PB2n+YC 及 YN+YC-PB1<sub>731-757</sub>, 即只表达其中一种蛋白的对照组。

[0027] 结果 (图 1A) 显示 YN-PB2n+YC-PB1<sub>731-757</sub> 组的相对荧光值并不比两个对照组 (YN-PB2n+YC 及 YN+YC-PB1<sub>731-757</sub>) 的相对荧光值高。所以 PB1<sub>731-757</sub> 不能和 PB2n 相互作用。

[0028] 为了检测 PB1<sub>731-757</sub> 与 PB1c 的相互作用,将表达 YC-PB1<sub>731-757</sub> 和 YN-PB1c 的两个质粒同时转到酵母菌株 ySC8 中以作为检测组(图 1B 中的 YN-PB1c+YC-PB1<sub>731-757</sub>,"+"表示用表达两个片段的质粒共转化酵母),也同时制备两个对照组:YN-PB2n+YC 及 YN+YC-PB1<sub>731-757</sub>,即只表达其中一种蛋白的对照组。

[0029] 结果(图 1B)显示 YN-PB2n+YC-PB1<sub>731-757</sub> 组的相对荧光值比对照组(YN-PB2n+YC 及 YN+YC-PB1<sub>731-757</sub>)的相对荧光值高一倍左右。所以 PB1<sub>731-757</sub> 能和 PB1c 相互作用。

[0030] 实施例 3、多肽片段 PB1<sub>731-757</sub> 克隆到真核表达载体 pFA-Flag-GFP 载体上

[0031] 用定点突变的方法将载体 pcDNA3.1-6HA(8) 中的 NdeI 酶切位点突变掉,引物为 NdeI-F:CATCAAGTGTATCGTATGCCAAGTAC;NdeI-R:CGTACTTGGCATAACGATACACTTGATG。测序正确后记为 pcDNA3.1-6HA-M,设计引物:Flag-F:CCCAAGCTTCATATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGGATCCGTGAGCAAGGGCGAGGAG;Flag-R:CCGGAATTCCTCCGGACTACTTGTACAGCTCGTCCATGC,将 Flag-GFP 从模板 pEGFP-N1(购自 clontech)中扩增出来,用 HindIII、EcoRI(Takara 公司生产)酶切所得到的 PCR 产物,并回收酶切产物,将该酶切产物连接到用 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。

[0032] 设计特异引物(见表 1)将 PB1<sub>731-757</sub> 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),关于质粒的来源参见文献(9)和(18))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-PB1<sub>731-757</sub>-GFP,即将 pFA-Flag-GFP 载体中的 Flag 片段替换为 PB1<sub>731-757</sub> 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 表示表达不同的肽(peptide)与 GFP 相连的融合蛋白(peptide-GFP)的载体。

[0033] 实施例 4、在 293T 细胞内检测片段 PB1<sub>731-757</sub> 对流感病毒 WSN33 聚合酶的抑制效果

[0034] 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,其分别用于表达病毒 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(4);pPolI-NP-Luc 为 50ng,构建载体时将萤火虫荧光素酶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,则萤火虫荧光素酶的活性就高,反之亦然,该质粒的来源参见文献(6);pRenilla(购自 Promega)为 100ng,转染后直接表达海肾(Renilla)荧光素酶,转染效率的高低直接体现在海肾荧光素酶的活性高低上,用于归一化转染效率(萤火虫荧光素酶的信号除以海肾荧光素酶的信号);以及 900ng 本发明中构建的多种质粒 pFA-peptide-GFP(pFA-PB1<sub>731-757</sub>-GFP 或 pFA-PB1<sub>1-25</sub>-GFP),用于表达肽与 GFP 的融合蛋白(PB1<sub>731-757</sub>-GFP 或 PB1<sub>1-25</sub>-GFP);具体过程如下:

[0035] 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 ;

[0036] 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 ;

[0037] 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 ;

[0038] 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。

[0039] 转染 24h 后检测萤火虫和海肾荧光素酶的活性 (用 promega 的双荧光素酶测定试剂盒),具体做法是 :先去培养基,用 1mlPBS/ 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  $-80^{\circ}\text{C}$  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) 检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶信号,检测的缓冲液各用 50ul 即可 ;将 Flag-GFP 一组的归一化后的萤火虫荧光素酶活性值设为 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。

[0040] 结果 (图 2A) 显示 PB1<sub>731-757</sub> 能很好的抑制流感病毒聚合酶的活性,和 PB1<sub>1-25</sub> 的效果相当。

[0041] 实施例 5、在人肺癌细胞 A549 中检测 PB1<sub>731-757</sub> 片段对流感病毒的抑制效果

[0042] 在 24 孔板 (购自 Corning 公司) 中培养 A549 细胞 (ATCC, CCL-185),当细胞生长至满度为 60% 时,将 0.45ug 的 pFA-peptide-GFP (pFA-PB1<sub>731-757</sub>-GFP 或 pFA-PB1<sub>1-25</sub>-GFP, 分别用于表达 PB1<sub>731-757</sub>-GFP、PB1<sub>1-25</sub>-GFP) 和 0.35ug 的 pPolI-Gluc-Infection (22) 通过实施例 4 所述的 PEI 转染方法转染到细胞中,其中 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萤火虫荧光素酶,而是 Gaussia 荧光素酶。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 荧光素酶到培养基中,细胞中病毒越多,培养基中的荧光素酶信号会越强,反之亦然,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 WSN33 病毒感染液感染细胞 (感染复数为 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), $37^{\circ}\text{C}$ , 2h ;去上清,用 PBS 洗 2 遍 ;加入病毒感染液液 2ml ;对照为不感染病毒的组 (Mock)。

[0043] 感染 12 小时后检测细胞的荧光素酶活性 :取上清 60ul,8000rpm,2min,取上清,放于  $-20^{\circ}\text{C}$  冻融一次后检测 ;将测得的转染 Flag-GFP 融合蛋白组的荧光素酶活性值减掉不感染病毒的组的荧光素酶活性值后设为 100%,测得的其他组的荧光素酶活性值同样减掉不感染病毒的组的荧光素酶值后,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。

[0044] 结果 (图 2B) 所示,PB1<sub>731-757</sub> 能很好的抑制流感病毒的复制,其与已报道的对流感病毒聚合酶有抑制效果的片段 PB1<sub>1-25</sub> 在抑制病毒复制方面效果相当。

[0045] 参考文献



- [0046] 1. Boivin, S., S. Cusack, R. W. Rnigrok, and D. J. Hart. 2010. Influenza A virus polymerase: structural insights into replication and host adaptation mechanisms. *J Biol Chem* 285:28411-7.
- [0047] 2. Boltz, D. A., J. R. Aldridge, Jr., R. G. Webster, and E. A. Govorkova. 2010. Drugs in development for influenza. *Drugs* 70:1349-62.
- [0048] 3. Clerc, S., C. Hirsch, D. M. Oggier, P. Deprez, C. Jakob, T. Sommer, and M. Aebl. 2009. Htm1 protein generates the N-glycan signal for glycoprotein degradation in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 184:159-72.
- [0049] 4. 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.
- [0050] 5. Fodor, E., L. Devenish, O. G. Engelhardt, P. Palese, G. G. Brownlee, and A. Garcia-Sastre. 1999. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J Virol* 73:9679-82.
- [0051] 6. 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.
- [0052] 7. Gietz, R. D., and R. H. Schiestl. 2007. Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* 2:38-41.
- [0053] 8. 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.
- [0054] 9. He, X., J. Zhou, M. Bartlam, R. Zhang, J. Ma, Z. Lou, X. Li, J. Li, A. Joachimiak, 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.
- [0055] 10. Hu, C. D., Y. Chinenov, and T. K. Kerppola. 2002. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* 9:789-98.
- [0056] 11. Hu, C. D., A. V. Grinberg, and T. K. Kerppola. 2006. Visualization of protein interactions in living cells using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 21:Unit 21.3.
- [0057] 12. Ng, A. K., M. K. Lam, H. Zhang, J. Liu, S. W. Au, P. K. Chan, J. Wang, and P. C. Shaw. 2012. Structural basis for RNA-binding and homo-oligomer formation by influenza B virus nucleoprotein. *J Virol*.
- [0058] 13. Ng, A. K., H. Zhang, K. Tan, Z. Li, J. H. Liu, P. K. Chan, S. M. Li, W. Y. Chan, S. W. Au, A. Joachimiak, T. Walz, J. H. Wang, and P. C. Shaw. 2008. Structure of the influenza virus A H5N1 nucleoprotein: implications for RNA binding, oligomerization, and vaccine design. *FASEB J* 22:3638-47.
- [0059] 14. Obayashi, E., H. Yoshida, F. Kawai, N. Shibayama, A. Kawaguchi, K. Nagata,

- J. R. Tame, and S. Y. Park. 2008. The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature* 454 :1127-31.
- [0060] 15. 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.
- [0061] 16. Ruigrok, R. W., T. Crepin, D. J. Hart, and S. Cusack. 2010. Towards an atomic resolution understanding of the influenza virus replication machinery. *Curr Opin Struct Biol* 20 :104-13.
- [0062] 17. Su, C. Y., T. J. Cheng, M. I. Lin, S. Y. Wang, W. I. Huang, S. Y. Lin-Chu, Y. H. Chen, C. Y. Wu, M. M. Lai, W. C. Cheng, Y. T. Wu, M. D. Tsai, Y. S. Cheng, and C. H. Wong. 2010. High-throughput identification of compounds targeting influenza RNA-dependent RNA polymerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 :19151-6.
- [0063] 18. Sugiyama, K., E. Obayashi, A. Kawaguchi, Y. Suzuki, J. R. Tame, K. Nagata, and S. Y. Park. 2009. Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase. *EMBO J* 28 :1803-11.
- [0064] 19. Torreira, E., G. Schoehn, Y. Fernandez, N. Jorba, R. W. Ruigrok, S. Cusack, J. Ortin, and O. Llorca. 2007. Three-dimensional model for the isolated recombinant influenza virus polymerase heterotrimer. *Nucleic Acids Res* 35 :3774-83.
- [0065] 20. Wunderlich, K., D. Mayer, C. Ranadheera, A. S. Holler, B. Manz, A. Martin, G. Chase, W. Tegge, R. Frank, U. Kessler, and M. Schwemmler. 2009. Identification of a PA-binding peptide with inhibitory activity against influenza A and B virus replication. *PLoS One* 4 :e7517.
- [0066] 21. Zhang, H., J. Chen, Y. Wang, L. Peng, X. Dong, Y. Lu, A. E. Keating, and T. Jiang. 2009. A computationally guided protein-interaction screen uncovers coiled-coil interactions involved in vesicular trafficking. *J Mol Biol* 392 :228-41.
- [0067] 22. 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. *Virology* 428 :29.





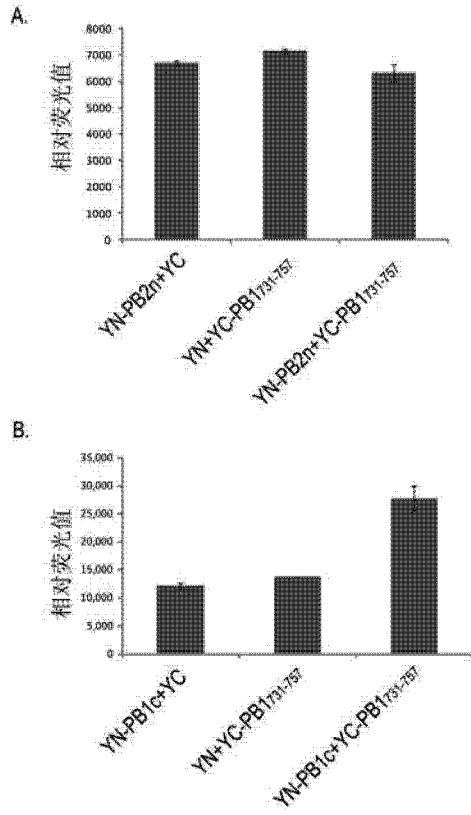


图 1

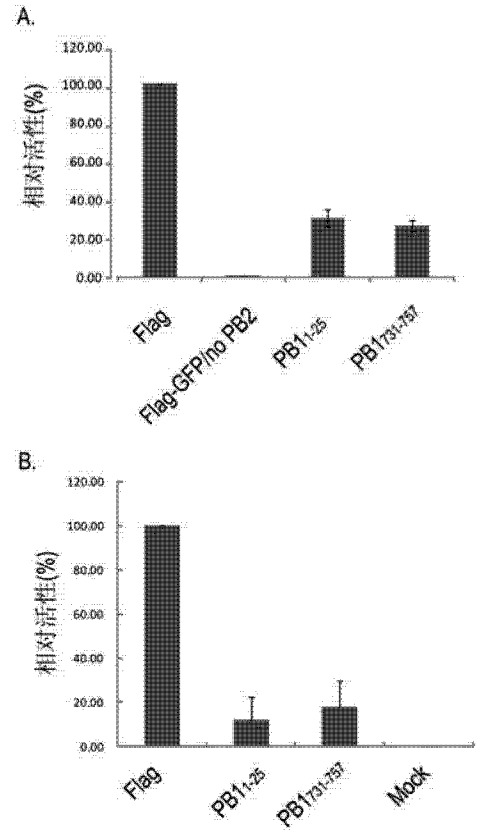


图 2