

## 抗草鱼出血病病毒多肽的结构分析\*

王冰<sup>1</sup> 柯丽华<sup>1</sup> 田波<sup>2</sup><sup>1</sup>(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)<sup>2</sup>(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

**摘要** 将草鱼出血病病毒(GCHV<sub>873</sub>)颗粒与随机噬菌体九肽库在体外作用, 三轮筛选后, 从300个转化的单菌落中获得16个与病毒高亲和力的噬菌体克隆。接着经过抗病毒试验获得6个能强烈抑制病毒复制的阳性噬菌体克隆, 能使病毒TCID<sub>50</sub>下降5个数量级。通过对阳性噬菌体克隆随机插入区域的核苷酸序列分析, 推导出多肽的氨基酸序列。发现6个能强烈抑制病毒复制的阳性克隆中多肽的氨基酸序列完全一致(NH<sub>2</sub>-Leu-Trp-Val-Gly-Gly-Gly-Arg-Asn-Ala), 该结果提示多肽的抗病毒能力与多肽特异性氨基酸组成及结构有关。因此, 抑制GCHV<sub>873</sub>复制特异性多肽的氨基酸序列的确定及结构分析, 不仅为人工合成抗草鱼出血病病毒的多肽奠定了基础, 同时也为抗病毒多肽制剂的研制提供了依据。

**关键词** 抗病毒多肽, 结构分析, 草鱼出血病病毒

目前粗制的草鱼出血病病毒疫苗效果不稳定, 而普通细胞疫苗又存在潜在的危险性。因此, 探索一条新的、安全可靠的抗病毒途径十分必要。随机肽库技术是近年国际上出现的一项具有极大潜力的崭新技术, 用来发现有价值的配体以及指导药物的开发<sup>[1]</sup>。它的最大优势在于氨基酸的化学多样性造成肽库中氨基酸序列种类的庞大, 这些肽能够通过单抗/多抗、受体、酶或其它的靶分子筛选出来。通过肽库筛选技术有可能筛选到既能与病毒紧密结合, 又能抑制病毒复制的特异性多肽, 像抗生素那样有效地抗病毒感染。近年来肽库技术作为一项抗病毒新策略, 开始应用于抗病毒方面的研究, 在高亲和力病毒抗体的筛选及重组疫苗的设计等方面已取得一些可喜的成果<sup>[2-4]</sup>, 为人工合成抗病毒多肽制剂提供了指导和帮助。

## 材料与amp;方法

**1 试剂及仪器** T7DNA聚合酶序列分析试剂盒购自Pharmacia Biotech公司(T7 Sequencing™ Kit)。分子生物学试剂、生化试剂及化学药品分别购自Pharmacia、Promega、Gibco-RBL等公司, 同位素 $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP购自杜邦公司, 序列分析仪为Bio-Rad公司产品。

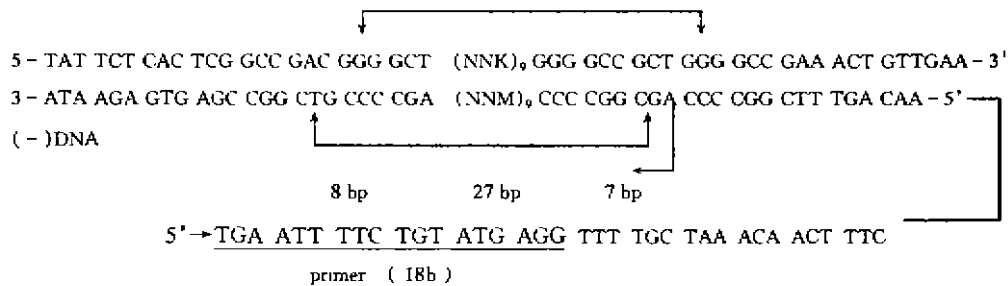
**2 病毒** 草鱼出血病病毒GCHV<sub>873</sub>, 由中国科学院武汉病毒研究所等单位分离并鉴定, 属于呼肠弧病毒科的新成员<sup>[5]</sup>。

**3 菌株** 大肠杆菌K-91是K-38的衍生物( $\lambda^-$ ), 为高频重组-Cavalli, 其基因型为thi<sup>[6]</sup>。

收稿日期: 1997-10-31, 修回日期: 1998-03-19

\* 本文获SCBA第七届国际学术大会(加拿大, 多伦多, 1997)资助, 在专题会上宣读过

4 随机噬菌体九肽库 肽库的构建方法参见文献[7],以 *fUSE5* 为载体构建随机九肽噬菌体表位库,在 *fUSE5* 衣壳蛋白Ⅲ的 N 端编码区具有 SfiI 的两个酶切位点,切割后产生的单链末端既彼此不互补,又不自我互补。两个位点之间的置换片段被酶切移去后,线性载体 DNA 片段不能自连。因此,只有当同源末端的 ds-DNA 外源片段插入后才能环化。电击转化后,在 MC1061 中扩增,构建起原始的九肽库,参见文献[8]。图 1 显示了随机噬菌体九肽库的重组噬菌体核酸框架结构中外源寡核苷酸插入位点及引物区的设计。



重组的融合衣壳蛋白Ⅲ的氨基酸序列

Recombinant pⅢ

NH<sub>2</sub>-Y S H S A D G A X<sub>9</sub> G A A G A E T V E

图 1 重组噬菌体 *fUSE5* 的核酸框架结构中外源寡核苷酸插入位点及引物区的设计

Fig. 1 Design of the foreign insert sites and primer region in recombinant *fUSE5* genome

注:(1)M 为等摩尔的 A 和 C;N 为等摩尔的 G、A、T 和 C;K 为等摩尔的 G 和 T,故 NNK 就代表了 32 种三联密码的等量混合物,可以编码所有 20 种氨基酸和琥珀型终止子。

(2)肽库的核苷酸随机序列种类可达到  $10^{14}$

Note:(1)N stands for an equal mixture of G, A, T and C. K stands for an equal mixture of G and T. Thus NNK represents an equal mixture of 32 triplets, including codons for all 20 amino acids along with the amber stop codon

(2)42-bp fragment - an equal mixture of  $32^9$  ( $\sim 10^{14}$ ) different nucleotide sequences.

5 阳性噬菌体克隆再转化大肠杆菌 K91 取  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  甘油保存的 K91 细胞  $50\text{ }\mu\text{L}$ ,加到  $3\text{ mL}$  LB 培养基(Kan  $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ )。  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,振荡培养过夜,使 K91 细胞活化。取  $150\text{ }\mu\text{L}$  过夜培养的 K91 细胞,加到  $10\text{ mL}$  TB 液(1.2% 蛋白胨,2.4% 酵母,0.4% 甘油 V/V,0.17mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,0.70 mol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )中,摇床快速振荡培养,  $180\text{ r/min}$ ,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $2\sim 3\text{ h}$ 。培养液 10 倍稀释后,测  $\text{OD}_{600}$  为 0.2。取  $100\text{ }\mu\text{L}$  阳性噬菌体克隆与  $200\text{ }\mu\text{L}$  上述 K91 细胞混合,室温下静置 30 min。将  $300\text{ }\mu\text{L}$  混合液加到预热的  $20\text{ mL}$  的 LB 培养基中(Tc  $0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ , Kan  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ )。在摇床上  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  剧烈振荡培养 1 h。取  $120\text{ }\mu\text{L}$  10 倍等比例稀释后,涂 LB 平板(含 Tc  $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ , Kan  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ )。放置  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,培养过夜。稀释比例从  $10^{-3}$ 到  $10^{-10}$ 。其余大量细胞液中添加 Tc 至  $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ ,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,继续摇床培养过夜,扩增噬菌体。

6 噬菌体克隆的纯化及 ssDNA 模板的提取 用无菌牙签挑选在抗生素平板(Tc  $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ , Kan  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ )上转化的 K91 重组单菌落,移至  $3\text{ mL}$  LB 培养基(含 Tc  $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ , Kan  $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ),  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $24\text{ h}$  摇床培养。然后,将  $1.5\text{ mL}$  培养液倒入  $1.5\text{ mL}$  离心管中,离心 1 min,将上清液  $1.2\text{ mL}$  移至另一离心管中,并加入 16% (V/V)的 PEG/NaCl,充分混匀,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  静置过夜。  $12000\text{ r/min}$  离心, 10 min, 去掉上清液。将沉淀溶解于  $1\text{ mL}$  TBS 中,待其完全溶解后,离心 1 min, 除掉不溶物。吸取上清液  $1\text{ mL}$ , 并移至另一离心管中,加入 16% (V/V) 的 PEG/NaCl,充分混匀后,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  静置过夜。  $12000\text{ r/min}$  离心, 10 min, 吸出上清液,得到噬菌体沉淀。接着,将噬菌体沉淀直接溶解于  $200\text{ mL}$  TBS 中, ( $5\times 10^{11}$  噬菌体颗粒/ $\mu\text{L}$ ),先后用等体积的苯酚、酚/氯仿、氯仿抽提

后,加入10%体积的3 mol/L 醋酸钠(pH 6.0)及两倍体积预冷的乙醇,混匀。放入液氮罐中冷冻(10 min),15000 r/min,离心30 min 沉淀 ssDNA,用70% (V/V)乙醇小心洗涤 DNA,真空干燥后,作为测序的模板。

7 测序方法 参照药盒说明书及常规测序分析,同位素为  $\alpha$ - $^{32}$ P dCTP。

## 结果与讨论

一个含有  $10^{13}$  以上特定长度的不同氨基酸顺序的肽库技术的发展,为许多存在于生物过程中分子间相互作用特性的研究提供了极为有效的方法。我们利用肽库这个特性,肽库技术用于抗病毒的研究并取得了初步的结果。

经过三轮体外亲和筛选后获得十六个与病毒高亲和力的噬菌体克隆,在细胞水平进行抗病毒试验,测定病毒的 TCID<sub>50</sub>,获得6个能够强烈抑制病毒复制的阳性噬菌体克隆。核苷酸序列测定结果如表1所示。我们意外地发现这6个能强烈抑制病毒复制的阳性克隆中多肽的核苷酸序列完全一致,表明它们实际上就是一种高亲和力特异性结合多肽。根据肽库构建设计,通过图2中的推导路线,由(-)DNA到(+)DNA及mRNA,推导出该多肽的氨基酸序列。能强烈抑制病毒复制的阳性克隆中的6个多肽的氨基酸序列完全一致(NH<sub>2</sub>-Leu-Trp-Val-Gly-Gly-Gly-Arg-Asn-Ala),说明多肽抗病毒的能力与多肽特异性氨基酸组成及结构有关。这9个氨基酸以疏水的脂肪族为主,共有6个脂肪族氨基酸(Leu, Val, Gly, Gly, Gly, Ala),其余为芳香族氨基酸(Trp)、碱性氨基酸(Arg)和酸性氨基酸各(Asn)各一个。该序列中间是三个连续的甘氨酸,其左右两侧分别为芳香族氨基酸及碱性氨基酸和酸性氨基酸,序列两头均是脂肪族氨基酸,没有二硫键存在,随机区域由一小段伸展的非限制性残基组成,没有构象的限制,具有高度的灵活性,随机多肽均呈线性,在溶液中为自由构象状态,且熵值较低。该序列的N端开头由一个疏水的亮氨酸组成,接着是芳香基团色氨酸,而后者类似与糖分子基团性质,可形成环状。多肽中间的关键残基为3个连续的甘氨酸,这不是偶然的,它作为重要的结构可能在芳香族侧链的空间构象中起着关键作用,使得这些短肽能模拟糖分子的分支结构特征及功能,疏水残基的存在使肽段之间具有一定潜力形成疏水键,增加了结构的稳定性。该结构中氨基酸序列排列方式与 Steven. E 和 Cwirla S. E. 等筛选发现特异性多肽序列框架相似<sup>[9]</sup>,中间数个甘氨酸,两侧为芳香族氨基酸,他们使用 pAFF1 为载体构建了一个六肽库。从  $3 \times 10^8$  的库中筛选出51个与单抗 3-E7 高度结合的六肽,而 3-E7 是  $\beta$  内啡肽的 N 端序列(Tyr-Gly-Gly-Phe)的特异性单抗。筛选出的51个噬菌体克隆中六肽的 N 端第一个残基与  $\beta$  内啡肽的 N 端序列一样均是 Tyr,其中有48个克隆的第二个残基与  $\beta$  内啡肽的 N 端序列一样也是 Gly,在进行亲和力比较时发现头1-2个氨基酸序列在肽段之间或蛋白质之间的结合中起着关键作用。

多肽与靶分子的结合具有特异性,多肽与草鱼出血病病毒颗粒紧密结合并抑制病毒的复制,其原理就象抗体病毒中和反应:当某一短肽与病毒颗粒结合后,不仅能模拟病毒的抗体,封闭病毒表面的抗原决定簇,还可能改变病毒表面蛋白质的结构,使得这些蛋白质在病毒感染过程中不能发挥作用。我们采用生物素化完整的 GCHV 病毒颗粒,从噬菌体库中筛选并获得针对病毒表面生物活性单位的高亲和力短肽,达到了抑制 GCHV 在细胞中复制的目的。抗草鱼出血病病毒的多肽氨基酸结构的确定,为以后合成人工抗病毒多肽提供了必要的前提。

表 1 多肽的基因编码序列(-)DNA 的确定

Tab.1 The identification of (-)DNA sequence of peptides

克隆 Clones	核苷酸序列 Sequences
1 CCC GTC-3'	5'-AGC GGC CCC <u>AGC ATT CCG CCC ACC CCC AAC OCA CAG</u> AGC
2 CCC GTC-3'	5'-AGC GGC CCC <u>AGC ATT CCG CCC ACC CCC AAC OCA CAG</u> AGC
3 CCC GTC-3'	5'-AGC GGC CCC <u>AGC ATT CCG CCC ACC CCC AAC OCA CAG</u> AGC
4 CCC GTC-3'	5'-AGC GGC CCC <u>AGC ATT CCG CCC ACC CCC AAC OCA CAG</u> AGC
5 CCC GTC-3'	5'-AGC GGC CCC <u>AGC ATT CCG CCC ACC CCC AAC OCA CAG</u> AGC
6 CCC GTC-3'	5'-AGC GGC CCC <u>AGC ATT CCG CCC ACC CCC AAC OCA CAG</u> AGC

注:从 X 胶片上可以直接读出阳性克隆的核苷酸序列,中间划有底线的部分是插入肽的编码序列,其余是噬菌体基因组本身的核苷酸序列。

Note: Reading directly six clones (-)DNA sequences from X-film, which have higher affinity, stranger anti-viral ability. The parts underlined mean (-)DNA sequences of inserts, the others are the genome of pIII.

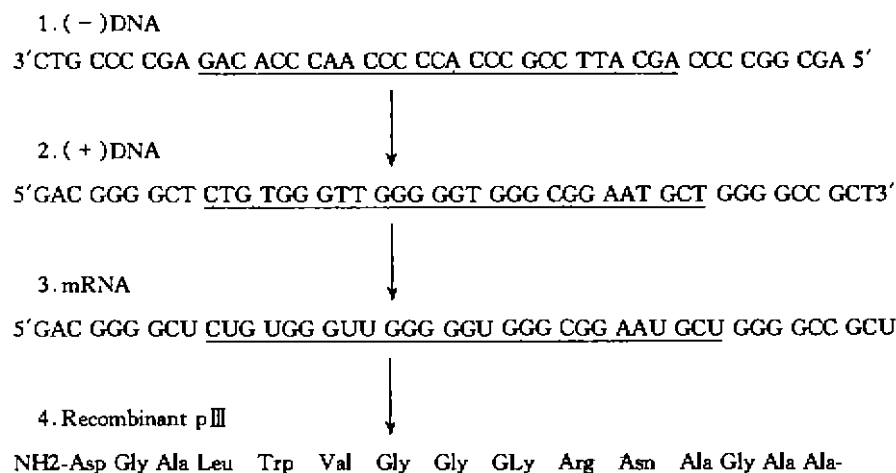


图 2 阳性克隆的氨基酸序列的推导

Fig.2 The deduction of the amino acid sequence of positive peptide

注:从 X 胶片上直接读出重组的 pIII 的(-)DNA 序列,由此可以推导出外源多肽的氨基酸序列。

Note: Through the identification of the recombinant phage *fUSE5* sequence (-)DNA sequence of peptides from X-film had gotten, then deduced (+)DNA, RNA and amino acid sequence of positive clones. The parts underlined are amino acid of positive clones.

试验已经证实在大多数情况下,含有关键残基的多肽能模拟功能型蛋白质表面的决定簇,而且开头的几个残基对与多肽之间的结合起着关键作用。Hoess, R. 等<sup>[10]</sup>在筛选能与糖分子特异性抗体 B3 结合的多肽时发现能模拟功能性糖分子的多肽,他们对非限制性噬菌体八肽库及含硫键的限制性六肽库进行筛选,三轮筛选后经 ELISA 法检测得到 10 个克隆,序列分析后发现 10 个克隆的氨基酸序列完全一样,编码八肽 APWLYGPA。进一步实验发现根据相应的氨基酸序列人工合成的八肽也能与 B3 紧密结合。因此以完整的病毒颗粒作为受体,应用随机肽库来筛选抗病毒的多肽,不需要了解病毒的蛋白质结构、基因组结构及复杂的病毒感染过程,而只要选出的特异性短肽能与病毒感染相关的重要靶位点结合,就达到了阻断病毒侵染细胞的效果。因此,比用核酶、反义 RNA 技术简单,后者在用于抗病毒研究时,需要了解病毒基因结构。肽库技术筛选出的与完整病毒颗粒特异结合的短肽,能有效地阻止病毒感染而不影响宿主细胞生长。抗 GCHV 复制的多肽的氨基酸序列的确定,为人工合成抗病毒多肽奠定了基础,也为抗病毒多肽制剂的研制提供了依据。我们将进一步研究特异性多肽在病毒颗粒表面的结合位点,推测结合位点与草鱼出血病病毒的 11 个结构蛋白片段的相关性,同时通过病毒体外转录试验,观察抗病毒多肽对草鱼出血病病毒的转录酶的影响。

### 参 考 文 献

- 1 Scott L K, Craig L. Random peptide libraries. *Current Opinion in Biotechnology*, 1994, 5:40-48
- 2 Thompson J, Pope T, Tung J S *et al*. Affinity maturation of a high-affinity human monoclonal antibody against the third hypervariable loop of human immunodeficiency virus: Use of phage display to improve affinity and broaden strain reactivity. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 256:77-88
- 3 Yang W. P, Green, K, Pinzsweney S *et al*. CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 into the picomolar range. *Journal of Molecular Biology*, 1995, 254:392-403
- 4 Dyson M. R, Murray K. Selection of peptide inhibitors of interactions involved in complex protein assemblies: Association of the core and surface antigens of hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:2194-2198
- 5 柯丽华,方勤,黎宜权. 一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性. *水生学报*, 1990, 14:153-159
- 6 Parmley S F, Smith G P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*, 1988, 73: 305-318
- 7 Scott, J K, Smith G P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 1990, 249: 386-390
- 8 Pasqualini R, and Ruoslahti E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. *Nature*, 1996, 380: 364-366
- 9 Cwirla S E, Peter E A, Barrett R W *et al*. Peptides on phage: A vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 6378-6382
- 10 Hoess, R, Brinkmann U, Handel T *et al*. Identification of a peptide which binds to the carbohydrate-specific monoclonal antibody B3. *Gene*, 1993, 128:43-49

## Constructural Analysis of Antiviral Peptide to Grass Carp Hemorrhage Virus

Wang Bing<sup>1</sup> Ke Lihua<sup>1</sup> Tien Po<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

<sup>2</sup>(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract** Through the reaction between GCHV<sub>873</sub> (Grass Carp Hemorrhage Virus) particles and random peptide library displayed on phage *in vitro*, after 3 rounds of affinity selection 16 phage clones from 300 clones have been got, which have high affinity with GCHV. Six of sixteen clones could inhibit the replication of GCHV in CIK *in vitro* and decrease the TCID<sub>50</sub> to half of index. The DNA sequence of phage clones and deduced sequence of amino acid of the inserted foreign fragments were analysed. The results show that the sequences of six clones are identical. The deduced sequence of amino acid is NH<sub>2</sub>-Leu-Trp-Val-Gly-Gly-Gly-Arg-Asn-Ala. It indicates that the ability of anti-GCHV is certainly related to specific structural information and amino acid sequence of peptides. The determination of antiviral peptide offers a fundamental practical advance in the synthesis of the antiviral peptides and provides a way of generating novel antiviral agents.

**Key words** Antiviral peptides, Constructural analysis, Grass carp hemorrhage virus