

噬菌体展示技术筛选抗轮状病毒多肽的试验研究

Screening for Peptides of Anti-rotavirus by Phage-displayed Technique

姚 宁^{1,2}, 姚伦广^{2*}, 张详满², 郭泰林³, 阚云超²

YAO Ning¹, YAO Lun-Guang^{2*}, ZHANG Xiang-Man², GUO Tai-Lin³ and KAN Yun-Chao²

1 西南交通大学药学院, 峨眉山 614202

2 中英南阳洛桑昆虫生物学联合实验室, 南阳师范学院, 南阳 473061

3 西南交通大学生物工程学院, 成都 610031

1 Pharmacy College, Southwest Jiaotong University, Emeishan 614202, China

2 China-UK NYNU-RRes Joint Lab of Insect Biology, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China

3 School of Bioengineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

摘 要 从噬菌体随机展示十五肽文库筛选出 4 个与轮状病毒粒子特异性结合多肽。经空斑减少抑制实验和 MTT 法分析表明其中 3 个多肽对病毒感染培养细胞具有抑制作用, 其中序列为 QSNPIHIITNTRNHP 的 C 肽具有显著抑制作用, 抑制效果达 93%, 另外 2 个多肽 A 和 B 抑制效果分别为 40% 与 50%。经过多肽序列分析发现这 3 个十五肽具有 2 个保守序列, 分别是第 2 至 8 个氨基酸残基 SNPIHII 和第 12~15 个氨基酸残基 NIP。胰蛋白酶水解位点分析表明 C 肽无裂解位点, 而 A 肽和 B 肽则分别具有 3 个和 4 个潜在水解位点。抑制病毒感染液中胰蛋白酶活性, 发现 A、B 两肽也能显著地抑制病毒离体感染。说明所筛选的多肽 2 个保守序列的完整对抗病毒感染起着重要作用。C 肽有望成为一种治疗轮状病毒感染的口服药物。

关键词 轮状病毒, 噬菌体展示, 抗病毒多肽, 空斑抑制

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0403-06

Abstract In this study, a 15-mer phage display peptide library was employed to pan against human rotavirus immobilized on solid phase. 4 different peptides were selected and could bind with rotavirus particles specifically. Plaque reduction neutralization test and MTT analysis results indicated that 3 of the peptides can inhibit rotavirus infecting in vitro. A peptide which sequence is QSNPIHIITNTRNHP showed the best efficiency—93% neutralization infectivity. Two other peptides A and B showed 40% and 50% neutralization infectivity respectively. Amino sequence analysis results indicate the 3 peptides containing 2 conserved motifs: SNPIHII and NIP. No putative trypsin hydrolysis site was found in C peptide, however A and B peptides showed 3 and 4 potential sites respectively. Using trypsin inhibitor, both A and B peptides showed the similar antiviral effect as that of C peptide. It suggests that the intactness of the 2 conserved motifs play an important role in counteracting virus infection. According to the results of this study, peptide C is hopeful to be exploited as an antiviral peptide drug.

Key words rotavirus, phage display, antiviral peptide, plaque inhibition

人轮状病毒(human Rotavirus)属于呼肠孤病毒科轮状病毒属, 5 岁以下的婴幼儿几乎全被感染过。

全球范围内因急性肠胃炎而住院的儿童中, 有 35%~52% 的患者由轮状病毒感染引起。在发展中国

家,估计每年有1亿2千5百万小儿患轮状病毒腹泻,其中有1800万表现为中重度患者,并且导致其中87万例因为严重脱水、电解质紊乱而死亡^[1,2]。在我国,有41%~60%左右的婴幼儿腹泻由轮状病毒感染所致,且由于轮状病毒在自然环境中较稳定,不容易自行失活,容易在幼儿园和学校、儿童医院等通过粪-口途径传播^[3]。目前,国内外均无针对轮状病毒感染的特效药物,治疗上只能采取对症疗法,需10天左右时间才能痊愈。美国食品和药物管理委员会(FDA)曾经在1998年8月批准了一种猴-人轮状病毒基因重配口服四价疫苗,但由于其具有引起发烧、产生肠套叠现象的风险而于14个月后退出现场^[4,5]。有效疫苗的缺少和特效药物的缺乏使得防治婴幼儿轮状病毒腹泻正成为世界卫生组织(WHO)优先解决的重大疾病之一。在尽快开展有效疫苗研究的同时,快速筛选特异性抗轮状病毒的药物正成为未来防治婴幼儿腹泻的主要手段之一。

噬菌体展示技术是90年代发展起来的一种体外筛选技术,它通过将外源基因克隆到噬菌体外壳蛋白pVIII或pIII的N-端从而将该基因融合表达并展示在噬菌体表面^[6]。用抗原去淘洗抗体或随机多肽构成的噬菌体展示文库,根据抗原-抗体反应原理,可以将与抗原紧密结合的抗体或多肽片段筛选出来^[7]。多肽在药物筛选过程中扮演着举足轻重的角色,主要因为它能有效地结合到靶蛋白的活性位点或具有生物学功能的相关位点,同时多肽的分子量小,达到肠胃后不易被降解且容易吸收,几乎不会受到破坏^[8]。因此噬菌体展示系统的高通量筛选,完全有可能筛选出多个针对不同抗原表位的多肽。而这些特异性抗轮状病毒的多肽有望联合起来单独做成口服制剂或者补加到口服补液盐(ORS)中用于临床防治轮状病毒腹泻,或者通过添加到儿童食品和饮料中做成抗病毒腹泻的保健品。

1 材料与方法

1.1 病毒与细胞

A组轮状病毒株由广州市儿童医院中心实验室提供,MA104细胞购自武汉大学保藏中心。MA104细胞使用补加100 μ g/mL的双抗(青霉素和链霉素)与10% FBS的MEM液体培养基(GIBCO)于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂中培养。

1.2 病毒的感染、收获与毒力测定

以终浓度5 μ g/mL的胰酶处理病毒感染液1h以活化病毒粒子,按病毒感染复数为0.5(moi = 0.5)剂

量接种对数生长期MA104单层细胞。吸附90min后,补加含0.5 μ g/mL胰酶的新鲜培养基,48~72h后(80%~90%细胞病变),离心收集细胞,反复冻融3次,离心去细胞碎片,收集病毒上清备用。病毒毒力测定按常规中性红染色空斑计数法进行。

1.3 病毒纯化

收获接种感染病毒72h后的MA104细胞,重悬于0.1mol/L PBS中,反复冻融数次使细胞破裂释放出病毒粒子。6000r/min离心10min,去细胞碎片,保留上清。上清中加入1/4体积的28%的PEG8000-NaCl溶液(用5.925% NaCl溶液将PEG8000配成28%的PEG8000-NaCl溶液)使PEG8000终浓度达7%,NaCl终浓度2.2%。将溶液至4 $^{\circ}$ C冰箱中搅拌处理18h(用磁力搅拌子)以聚合与沉降病毒粒子。8000g离心30min,将沉淀溶于适量0.1mol/L PBS-Ca(2mmol/L CaCl₂溶于0.1mol/L PBS),使溶液呈透明状。重悬溶液置于35%的蔗糖垫上(用0.1mol/L PBS-Ca配置),83000g离心3h,去上清,取病毒沉淀。适量PBS溶解沉淀,取1~2mL加入到配置好的蔗糖连续梯度溶液离心管中(由66%、35%、20%不同浓度的蔗糖,小心注入到离心管中配置好,过夜后即可形成连续梯度),80000g,水平离心4~6h。从离心管中小心取出病毒带,10倍PBS重悬收集病毒带,4 $^{\circ}$ C过夜透析,去蔗糖成分,并使用固体PEG8000浓缩病毒样品,取样进行电镜观察,确定病毒的纯度和完整度。病毒适当稀释后,测OD₂₈₀和OD₂₆₀计算病毒的浓度,在波长280nm和260nm处测病毒蛋白的光密度值,按Warburg-Christain法计算:蛋白质浓度(mg/mL) = 1.45 × OD₂₈₀ - 0.74 × OD₂₆₀。

1.4 噬菌体随机十五肽展示文库的淘洗

噬菌体随机十五肽展示文库以及敏感宿主菌K91/Kanblue由GP. Smith教授惠赠,辅助噬菌体M13KO7本室保存^[9]。文库拯救、淘洗以及筛选过程基本参考文献9进行。其简要流程如下:用纯化的轮状病毒(RV)溶液5mL(50 μ g/mL,PBS稀释)包被免疫管(Nunc,maxisorb,4 $^{\circ}$ C过夜),PBS洗2次后PBS(PBS中含5%的脱脂奶粉)于37 $^{\circ}$ C封闭1h。去封闭液,PBS洗1次后加入4 $^{\circ}$ C储存的约10¹¹ pfu噬菌体十五肽展示文库,用PBS补充至总体积约4.5mL,37 $^{\circ}$ C结合2h。接着用PBS(含0.5% Tween 20的PBS)和PBS各洗20次,以洗去没有结合上的噬菌体颗粒。将结合至免疫管的噬菌体用0.5mL酸性缓冲液(0.2mol/L glycine-HCl buffer pH2.2)洗脱下来,用等体积碱性缓冲液(0.5mol/L Tris-HCl, pH

pH 9.1)中和。洗脱下来的噬菌体文库感染大肠杆菌 *Escherichia coli* k9I ($OD_{600} = 0.5$) 250r/min 37℃培养 1h。离心沉淀菌体,适量培养基重悬并涂布 10 个 $\phi = 17\text{cm}$ 的平板,37℃倒置培养过夜。用 10mL NZY 培养基将菌落全部刮下来,按 1mL/管加甘油储存在 -70℃备用或者取 1 管直接进行下一轮淘洗。此后几轮筛库,步骤同第一轮淘洗,但包被的病毒浓度递减,第二轮 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,第三轮 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。当得率(洗脱后的噬菌体数/参加淘洗的噬菌体数)不再增加,停止淘洗,保留最后一轮筛选的单菌落进行特异性结合筛选。

1.5 噬菌体文库的拯救

在 10mL 的 NZY 培养基中加入甘油储存的文库 37℃ 250r/min 恒温培养 1hr。加入 4×10^{10} pfu 的辅助噬菌体 M13K07,37℃,250r/min 继续恒温培养 1h。1000 \times g 离心 10min 沉淀菌体,小心弃去上清。将沉淀用 10mL NZY 培养基轻轻重悬,37℃ 250 r/min 恒温培养过夜。1000 \times g 离心 20min 沉淀菌体,上清加入 2mL 的 PEG/NaCl (20% PEG-8000/2.5mol/L NaCl),充分混合后,置于冰上 30 ~ 60min,10000 \times g,4℃离心 20min。弃上清,倒置离心管使其自然干燥。加入 10mL PBS 溶解并用 0.45 μm 的滤膜过滤,4℃保存备用,或直接用于下一轮的淘洗。

1.6 ELISA、DNA 测序和多肽合成

经过几轮淘洗并使噬菌体达到饱和(淘洗后噬菌体文库滴度不再升高),挑选最后一轮平板上的菌落进行培养和噬菌体拯救,并经 ELISA 测定其与 RV 结合的特异性。在 96 孔细菌培养板中每孔加入 200 μL NZY 培养基,并从最后一次淘洗的文库菌落中随机挑取单克隆至 96 孔细菌培养板,37℃、50 r/min 培养过夜。用 Sigma 离心机(酶标转头)1000 r/min 离心 15min。弃上清,每孔加入 100 μL 含 M13K07(109PFU) NZY,37℃、50r/min 继续培养 1h。1000r/min,10min 沉淀菌体,弃上清,加 200 μL NZY 培养基重悬,37℃,50r/min 恒温培养过夜。1000r/min,20min 沉淀菌体,上清中含有噬菌体颗粒可直接用于 ELISA。

200 μL RV (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 溶液/孔于 4℃ 包被 96 孔酶标板 4h, PBS 洗板 3 次后 200 μL PBSM 封闭 1h。洗板 3 次,每孔加 100 μL 上述 96 孔培养板中的噬菌体上清和 100 μL PSBM 结合 1h。洗涤后每孔加入以封闭液 PBSM 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的 M13 噬菌体抗体 (HRP-M13 antibody, Pharmacia) 100 μL , 37℃ 静置 1h。此后洗涤,显色,终止按常规

方法进行。最后于 BIO-RAD 酶标仪读取 405nm 处 OD 值。以 BSA 无片段插入的空载体噬菌体为阴性对照。选取 OD 值 > 0.5 的阳性菌落扩增、甘油保种并委托北京奥科生物有限公司测序。分析测序结果,翻译成相应的十五肽,委托上海联合基因公司合成。

1.7 空斑抑制中和试验 (plaque reduction neutralization test, PRNT)

预先接种细胞于 6 孔板中,待单层细胞贴壁铺满到 80% 左右。将上述合成的十五肽以不同的浓度与活化的轮状病毒混合,以 MOI = 0.001 感染 6 孔板中培养的细胞。1h 后弃感染液,基础培养基洗 3 次,洗去游离的病毒粒子。加入 1mL 42℃ 含 0.75% 低熔点琼脂糖的完全培养基覆盖单层细胞,室温下放置 30min,待琼脂糖凝固后,滴加少许完全培养基覆盖,放 37℃ 培养。72h 后,加 0.1% 的中性红染色 0.5 ~ 1h,用 PBS 轻洗,由于中性红只染活细胞,不染死细胞,这样就可红色的背景下计算白色的空斑数。分别以病毒感染液以及 BSA 与病毒混合液作为阳性与阴性对照。

1.8 MTT 法检测细胞存活率

96 孔板内接种 105 细胞,待细胞完全贴壁后,将合成的多肽按一定量与活化的轮状病毒混和液按 moi = 1 接种细胞。48h 后将上述 96 孔板中的细胞每孔加入 10 μL MTT (5mg/mL),继续培育细胞 4h;在每孔加入 MTT 溶解液(底物成分为 20% SDS/50% DMF)100 μL ,继续培育细胞 4h,用丙酮终止反应,在 Biorad 酶标仪上读取 570nm 的 OD 值。测定时设置不加细胞的空白对照孔(培养基)。按以下公式计算细胞的存活率:细胞存活率% = 样品 OD_{570} 平均值/空白对照 OD_{570} 平均值 \times 100%。该方法的基本原理是活细胞线粒体脱氢酶能将 MTT 盐还原成蓝紫色的甲瓩颗粒,以颗粒溶解后呈现的颜色深浅反映细胞活性。因此,按颜色的深浅能判定存活细胞的数量,从而评价多肽对病毒抑制的能力。

2 结果

2.1 轮状病毒的纯化与鉴定

在噬菌体展示系统筛选目的结合物过程中,用于淘洗的目标蛋白是否纯净是能否获得特定结合多肽的基础。因此本研究采用简单而有效的方法来纯化轮状病毒,在获得纯净病毒同时尽量保持其完整的结构。使用 PEG-NaCl 方法能够有效沉降大的病毒颗粒,可以去除大部分可溶性细胞杂蛋白。重溶

后经过蔗糖垫进行病毒粒子浓缩,既可去除伴随病毒粒子沉降的大分子蛋白,进一步富集了病毒粒子,而蔗糖垫可有效保护病毒粒子免受超速离心力的破坏。此后经过密度梯度离心分离病毒带和透析除糖,已经能获得很纯净且完整的病毒颗粒。而电子显微观察表明所获得的病毒基本无其他杂质污染,可直接用于抗轮状病毒多肽的筛选。使用空斑法将此纯化的轮状病毒进行毒力测定,发现每 $100\mu\text{g}$ 病毒滴度约为 10^8 ,比理论值 10^9 几乎少了一个数量级别,说明病毒经过数级离心等过程,部分失去了感染力,但是由于病毒粒子结构完整,并不影响下面的淘选质量。

2.2 与 RV 特异性结合十五肽的淘选

为了从噬菌体十五肽展示文库中筛选出与 RV 特异性结合的多肽,十五肽展示文库在辅助噬菌体 M13K07 的辅助感染下转变成噬菌体形式的文库,并以完整病毒粒子为固相靶抗原,对十五肽展示文库进行筛选。筛选得到的噬菌体再重新感染大肠杆菌 *E. coli* 构成二级文库再进行下一轮筛选。在整个淘洗过程中,每次都对淘洗后的次级文库进行滴定,计算其菌落形成单位(colony-forming units, cfu)。经四轮淘洗后发现,第一轮筛选后得到的二级文库容量约为 1.2×10^5 ,经过第二轮筛选后,噬菌体进一步富集,容量达到 6.7×10^6 ,富集比达到 55,第三轮时已经增加不多,为 4.8×10^6 ,富集比为 110,但是与第 2 轮相比较的话,富集比为 $2(110/55 = 2)$,无显著增加。说明噬菌体的富集已经达到饱和状态,而得率也相差不大,没必要继续进行筛选(表 1)。淘选过程中逐步减少靶蛋白的量以提高淘选效果,第一轮靶蛋白为 $6\mu\text{g}/\text{孔}$,第二轮为 $2.5\mu\text{g}/\text{孔}$,第三轮为 $1\mu\text{g}/\text{孔}$,这样有利于淘选到高亲和力的结合肽。

表 1 淘洗过程中噬菌体的选择性富集

Table 1 Selected enrichment of phages by biopanning

	Round 1	Round 2	Round 3
Phages loaded (cfu)	2×10^{11}	3×10^{11}	4×10^{11}
Phages eluted (cfu)	1.2×10^5	6.7×10^6	4.8×10^6
Rotavirus (μg)	6	2.5	1
^a Yield/ μg (%)	1×10^{-5}	5.5×10^{-4}	1.1×10^{-3}
^b Enrichment rate	1	55	110

a: Yield/ $\mu\text{g} = (\text{phages eluted} / \text{phages loaded}) \times 100\% / \mu\text{g}$;

b: Enrichment rate: Yield1 = 1 (round 1's yield to be 1), Yield2/Yield1, Yield3/Yield1.

2.3 噬菌体展示多肽与 RV 的体外特异性结合

在最后一轮筛选结束后,随机挑取 190 个单克隆进行 ELISA 实验,检测噬菌体展示多肽与 RV 结合的特异性。在这 190 个克隆中,经过第一次

ELISA 共筛选出 29 个阳性克隆。在对这 29 个阳性克隆进一步 ELISA 验证以后,挑选 10 个强阳性克隆进行下一步实验。图 1 显示这 10 个克隆中,展示多肽 2 号和 8 号在 405nm 处显示出最强的吸收值,均大于 0.890。其他 8 个克隆在 405nm 的 OD 值在 0.66 和 0.86 之间,而阴性对照小牛血清白蛋白(BSA)的 OD₄₀₅ 仅为 0.079。

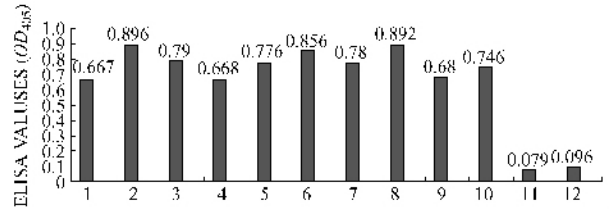


图 1 各样品在 405nm 的 ELISA 测定值

Fig. 1 ELISA assay in 405nm

1~10: numbers of selected colony; 11: negative control BSA; 12: extracts of phage carrier without any insert fragment. Every sample is measured three times in 405nm, every OD value in the figure is the average.

2.4 特异性多肽的序列分析

将 10 个特异性强的克隆提取噬菌体质粒 (phagemid), 进行核苷酸序列测定,并推导出相应的氨基酸序列。各多肽的核苷酸序列和推导的氨基酸序列见表 2。其中 1、5 号的氨基酸序列一致,命名为 A 肽, KSNPIHIQNRNRNIP; 2、9 号氨基酸序列一致,命名为 B 肽, KSNPIHIKNRNRNIP; 3、7、10 号的氨基酸序列一致,命名为 C 肽, QSNPIHIITNTRNHP。6、8 号氨基酸序列一致,命名为 D 肽, SPKTTQPPNHIHSIP。表 2 结果显示,前三种多肽具有较高的同源性,有 2 个区域一致,分别是第 2 至 8 个氨基酸残基 SNPIHI 和第 12~15 个氨基酸残基 NIR(相同氨基酸用下划线表示)。推测可能这 2 个保守与和轮状病毒颗粒结合过程中具有重要作用。网上 Blast 比对结果表明这 2 个保守基序均没有发现其同源序列,说明其是一类新的多肽。D 肽与前面 3 个多肽序列不同,也没有相应的保守序列,推测其与 RV 结合部位不同于前者。

表 2 不同特异性多肽的氨基酸序列分析

Table 2 Amino acid sequence analysis of 10 specifically peptides

Number of peptides	Sequence	Putative trypsin lysis sites
1, 5 (A)	K <u>SNPIHI</u> Q <u>NRR</u> NIP	KS, RR, RN, 3
2, 9 (B)	K <u>SNPIHI</u> K <u>NRR</u> NIP	KS, KN, RR, RN, 4
3, 7, 10 (C)	Q <u>SNPIHI</u> IT <u>NTR</u> NHP	0
6, 8 (D)	SPKTTQPPNHIHSIP	KT, 1

2.5 特异性多肽的抗病毒活性

上述研究表明,多肽 A、B、C、D 能特异性地与 RV 的特定位点结合,经分析其中 A、B、C 这 3 个多肽具有 2 个保守序列,而 D 肽和上述 3 个多肽几乎没有多少同源性。推测前 3 个肽和 D 肽与 RV 的结合位点并不一致,抗病毒效果也有显著差异。为确定结合到 RV 上的这些多肽是否能抑制轮状病毒的感染,首先按照所测定的序列进行多肽合成,使用空斑减少中和实验和 MTT 法两种方法来检测多肽对病毒的抑制作用。通过病毒与多肽感染细胞后,导致空斑数减少以及活细胞数比例的增加来进行各多肽中和病毒能力的评价。

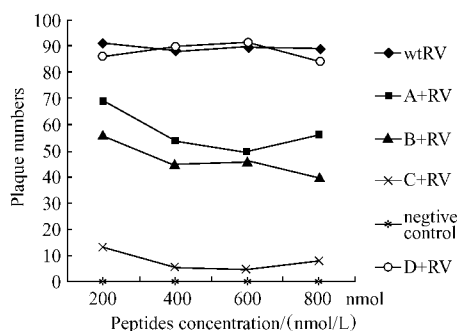


图 2 空斑减少中和实验

Fig. 2 Plaque reduction neutralization test

在空斑抑制实验中,以 $moi = 0.001$ 进行感染,很容易在 6 孔板进行空斑计数(空斑数在 100 个以内)。图 2 可见,多肽 D 与 RV 的体外结合能力最强 ($OD_{405} > 0.85$),而空斑抑制结果表明其对 RV 没有明显的抑制作用,推测其与 RV 的结合位点为感染非关键部位,同时序列分析结果表明该多肽完全不同于其它 3 种多肽。而多肽 C 对病毒的抑制能力最强,当多肽浓度为 400nmol/孔时,病毒所形成的空斑数仅为 6 个,而当没有任何多肽作用时,病毒所形成的空斑数为 90 个左右,可见由于多肽 C 与病毒结合后,抑制效果为 93%,有效地抑制了病毒对细胞的感染。另外 2 个多肽 A 和 B 在不同浓度下对病毒也有一定的抑制作用,当使用 400~800nmol 时,分别使得病毒空斑数目下降到 54 个和 45 个,但效果明显不如多肽 C,抑制效果仅为 40% 与 50%。由于 A、B、C 这 3 种多肽具有较大的同源性,并且有 2 个相同的保守区,从理论上推测其对病毒的抑制作用应该相同。经过进一步研究分析,发现 3 种多肽具有的胰蛋白酶水解位点数目不一致,A 肽多达 4 个潜在的水解位点,B 肽具有 3 个潜在位点,而 C 肽没有相应水解位点。由于轮状病毒感染离体细胞必须

通过胰酶部分裂解病毒的衣壳蛋白后才能有效感染,因此推测 A 肽和 B 肽被活化的病毒感染液中的胰酶所降解,从而造成对其抗病毒活性的降低。而 C 肽因为不含水解位点,在活化的病毒感染液体中保持完整,因此能够起到抑制病毒的作用。

MTT 法测定多肽对病毒的抑制效率的结果表明(表 3),在使用相同病毒感染量情况下($moi = 1$),24h 后含 400nmol 多肽 C 的病毒感染液接种的细胞存活率为 93%,而含多肽 A 和 B 的病毒感染液接种后细胞存活率仅分别为 42% 和 36%,含多肽 D 的病毒感染液接种细胞后细胞存活率仅为 12%,几乎对病毒感染没有抑制作用。由以上结果可以推断,多肽 C 能够有效地干扰轮状病毒的感染过程,从而达到较好的抗病毒效果,这和空斑分析结果一致。

表 3 MTT 法分析多肽抗轮状病毒效果

Table 3 Anti-rotavirus effect of the peptides by MTT assay

	blank	A+RV	B+RV	C+RV	D+RV	RV
OD_{570}	0.91	0.39	0.33	0.85	0.11	0.07
Liability/%	100	42	36	93	12	8

2.6 胰酶对病毒活性的影响

经分析,多肽 A、B 中含有多个胰酶水解位点,为了排除病毒感染液中胰酶被多肽 A 和 B 消耗而造成活化病毒酶量不够,在保持多肽浓度不变的情况下(400nmol),将胰酶用量加大到 4 倍,重新进行空斑分析,结果空斑数依然仅下降到 55 和 48 个,其抑制病毒效果略有下降,推测与胰酶对多肽的充分降解有关。同样的多肽 C 则能将病毒空斑数抑制到 6 个。

为了进一步验证是否胰酶影响了多肽 A 和 B 的活性,首先将病毒液用胰酶活化后,加入 2 倍过量胰蛋白酶特异性抑制剂(Trypsin Inhibitor Soybean, Merk 公司)抑制其活性。这种无胰酶活性的活化病毒再与 400nmol 的合成多肽混合使用,以 $moi = 1$ 接种细胞,使用 MTT 法分析细胞存活率,结果发现,A 肽和 B 肽均能有效地抑制病毒,细胞存活分别达到 90% 和 88%,几乎和 C 肽无显著差异(表 4)。这里不使用空斑抑制分析的原因在于没有胰酶的情况下很难形成清晰的空斑,给计数造成困难。MTT 法结果表明病毒感染液中胰酶影响了 A 与 B 肽的抗病毒活性,在移去胰酶后,其中和病毒效果得到加强。这是由于 A 肽和 B 肽含有几个胰酶水解位点,在胰酶的作用下,多肽被水解,造成 2 个保守区的裂解,从而无法有效地抑制病毒。而 C 肽无水解位点,不被胰酶消化,2 个保守区保持完整,能够达到有效抑

制病毒的效果。而在前面实验结果中,因为活化轮状病毒所使用胰酶浓度较低,会有部分 A 肽或者 B 肽没有完全裂解,保留了 2 个保守区,因此依然能部分抑制病毒。

表 4 MTT 法分析多肽对去胰酶轮状病毒(RV⁻)活性的影响

Table 4 Non-trypsin RV(RV⁻) activities affected by the 3 peptides by MTT assay

	Blank	A + RV ⁻	B + RV ⁻	C + RV ⁻	RV ⁻
OD ₅₇₀	0.91	0.82	0.80	0.85	0.05
Livability/%	100	90	88	93	5

3 讨论

多肽有效地结合到靶蛋白的活性位点或具有生物学功能的相关位点而在药物筛选过程中担任重要角色。就病毒而言,主要是由所有的囊膜蛋白和其它结构蛋白构成特定的病毒形态后,通过结合细胞表面受体进入细胞内,这一复杂的特征与病毒感染的启动密切相关,也为我们寻找有效的药物作用靶标提供了有价值的信息。噬菌体多肽展示系统的应用,为发现和研 究抗病毒药物提供了一个有效的平台。Dyson 等从噬菌体六肽展示文库中筛选到一个短肽,它能有效地阻断乙肝病毒囊膜蛋白和核心抗原蛋白的相互作用,通过改变病毒的形态而抑制病毒的感染^[10]。Hong 等研究者从噬菌体六肽展示文库中筛选到一个多肽,它能通过干扰 II 型腺病毒的五邻体衣壳粒与其纤维结构域的相互作用而阻断病毒的进攻^[11]。

本研究从噬菌体十五肽展示文库中筛选出来 3 个同源多肽,序列分析表明这 3 个多肽具有 2 个相同的保守序列,这 2 个序列可能在结合到 RV 关键蛋白的活性位点中起了重要作用。体外感染分析结果表明,只有 C 肽能够有效抑制病毒的感染,而 A 肽和 B 肽的抗病毒效果不如 C 肽,虽然其保守序列一样。由于在轮状病毒感染离体细胞需要使用胰酶活化,有可能胰酶干扰了多肽 A 和 B 的活性。通过对 3 种多肽序列的胰酶水解位点分析发现,A 肽具有 4 个潜在位点,B 肽具有 3 个,而 C 肽没有潜在水解位点。为了排除胰酶影响,将病毒活化后再去掉胰酶,结果发现 A 肽、B 肽和 C 肽一样,也能有效地抑制病毒感染。以上结果表明,所筛选到的 3 种特异性多肽的抗病毒活性与 2 个保守序列的完整性极为相关。而多肽 C 因为不含胰酶水解位点,非常适

用于制备口服制剂。

本实验主要通过空斑形成减少法和 MTT 法 2 种方法对病毒抑制效果进行观察,两种结果相互印证和支持,这也是使用离体培养细胞评价药物抗病毒效果的通用方法。在无法获得清晰空斑或者没有可传代敏感细胞系的情况下,使用 MTT 法评价抗病毒效果也是一种方便有效的方法。虽然获得了特异性较强的多肽 C,依然需要进一步通过小鼠体内试验从活体水平证明是否能在体内真正抑制病毒感染。由于合成多肽价格昂贵,下一步需要使用串联表达等方法在细菌中进行发酵表达和纯化,为制备抗轮状病毒口服制剂打下基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Kapikian AZ, Chanock RM, Fields BN, Knipe DM, Howley PM (ed.), Fields Virology 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa. Rotaviruses, 1996, pp. 1657 - 1708.
- [2] Glass RI, Kilgore PE, Holman RC, et al. The epidemiology of rotavirus diarrhea in the United States: surveillance and estimates of disease burden. *J Infect Dis*, 1996, **174**(Suppl.1) S5 - 11.
- [3] Zhang CF(张春芳), Jia LY(贾立英). Epidemiology survey of rotaviruse infection in Asia region. *The Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*(中国当代儿科杂志), 2006, **8**(1): 79 - 82.
- [4] Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock R, et al. Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus induced diarrhea in infants and young children. *J Infect Dis*, 1996, **174**(Suppl.1) S65 - 72.
- [5] Barnes G. Intussusception and rotavirus vaccine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1999, **29** 375.
- [6] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, **228**: 1315 - 1317.
- [7] Soot JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 1990, **249** 386 - 390.
- [8] Brian KK, Kurakin AV, Hyde-DeRuyscher R. From peptides to drugs via phage display. *Drug Discov Today*, 1998, **3**(8): 370 - 378.
- [9] Smith GP, Soot JK. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol*, 1993, **217** 228 - 257.
- [10] Dyson M, 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.
- [11] Hong S, Boulanger P. Protein ligands of the human adenovirus type 2 outer capsid identified by biopanning of a phage-displayed peptide library on separate domains of wild-type and mutant penton capsomers. *EMBO J*, 1995, **14** 4714 - 4727.