



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101724633 A

(43) 申请公布日 2010.06.09

(21) 申请号 200910191848.6

(22) 申请日 2009.12.10

(71) 申请人 中国人民解放军第三军医大学
地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街
30号

(72) 发明人 王军平 王艾平 陈芳 陈默
许杨 粟永萍 程天民

(74) 专利代理机构 重庆志合专利事务所 50210
代理人 胡荣琿

(51) Int. Cl.

C12N 15/12(2006.01)

C12N 15/85(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

C12Q 1/02(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

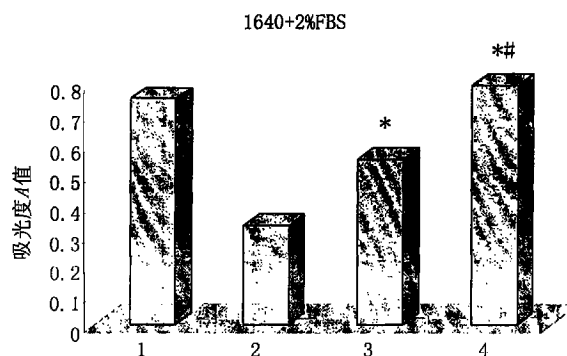
权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 1 页

(54) 发明名称

人 α -防御素抗病毒活性突变体的筛选方法

(57) 摘要

本发明公开了一种人 α -防御素抗病毒活性突变体的筛选方法,有以下步骤:人 α -防御素的定点随机突变、突变体库构建、突变体在 CHO 细胞中的定点整合与均一性表达,以及高效抗病毒活性突变体的筛选。本发明方法通过突变与筛选使人 α -防御素分子,在保留其基本生物学特性的基础上抗病毒能力显著提高,为寻找和研制高效、低毒抗病毒药物开辟一条新途径。



1. 一种人 α -防御素抗病毒活性突变体的筛选方法,其特征在于有以下步骤:

1) 人 α -防御素突变体 cDNA 文库的构建:

A. 选择人 α -防御素分子中具有适应性进化潜能的氨基酸位点作为突变位点;

B. 通过 DNA 合成和 PCR 扩增获得编码人 α -防御素突变体的 cDNA 片段;

C. 构建含有人 α -防御素突变体 cDNA 片段的质粒文库;

2) 人 α -防御素突变体在 CHO 细胞中的定点整合与均一性表达:

A. 特定 CHO 细胞的培养:

复苏并传代培养染色体上带有 FRT 位点的 Flp-In-CHO 细胞;

B. 编码人 α -防御素突变体的 cDNA 在 CHO 细胞中的定点整合;

C. 表达人 α -防御素突变体的阳性细胞的筛选及单克隆化;

3) 抗病毒活性筛选;

4) 抗病毒活性显著增强的人 α -防御素突变体的生物学特性鉴定。

2. 根据权利要求 1 所述的人 α -防御素抗病毒活性突变体的筛选方法,其特征在于:步骤 1) 所述的通过 DNA 合成和 PCR 扩增获得编码人 α -防御素突变体的 cDNA 片段,是指采用化学法合成在突变位点引入随机密码子序列的正、反义人 α -防御素分子的单链 DNA 片段,两条 DNA 片段之间存在至少 18bp 的互补交叉重叠区,然后以两条链退火、延伸后形成的双链 DNA 分子做为模板,再通过 PCR 扩增获得编码人 α -防御素突变体的 cDNA 片段。

3. 根据权利要求 1 所述的人 α -防御素抗病毒活性突变体的筛选方法,其特征在于:步骤 1) 所述构建含有人 α -防御素突变体 cDNA 片段的质粒文库,是指通过酶切、连接反应将编码人 α -防御素突变体的 cDNA 片段插入 pcDNA5/FRT 质粒载体中,转化大肠杆菌感受态细胞,获得 10^5 以上的阳性克隆,提取全部阳性克隆的质粒 DNA,即得人 α -防御素有效突变体 cDNA 文库。

4. 根据权利要求 1 所述的人 α -防御素抗病毒活性突变体的筛选方法,其特征在于:步骤 2) 所述的编码人 α -防御素突变体的 cDNA 在 CHO 细胞中的定点整合,是指将编码人 α -防御素突变体的 cDNA 片段定点插入到 CHO 细胞的 FRT 位点。

5. 根据权利要求 1 所述的人 α -防御素抗病毒活性突变体的筛选方法,其特征在于:步骤 2) 所述的表达人 α -防御素突变体的阳性细胞的筛选与单克隆化,是指通过潮霉素 B 抗性筛选表达有人 α -防御素突变体的 CHO 细胞,并采用 ELISA 和 Western blot 对阳性细胞进行鉴定,再将潮霉素 B 抗性筛选出的阳性细胞接种至 96 孔板,进行单细胞培养 2-3 周。

6. 根据权利要求 1 所述的人 α -防御素抗病毒活性突变体的筛选方法,其特征在于:步骤 3) 所述的抗病毒活性筛选,是指将含有人 α -防御素突变体的 CHO 细胞上清与病毒液共同孵育 vero 细胞,通过分析 vero 细胞的保护率而筛选出抗病毒活性增强的人 α -防御素突变体。

7. 根据权利要求 1 所述的人 α -防御素抗病毒活性突变体的筛选方法,其特征在于:步骤 4) 所述的抗病毒活性显著增强的人 α -防御素突变体的生物学特性鉴定,包括 DNA 与氨基酸序列分析、细胞毒性分析和溶血性分析。

人 α - 防御素抗病毒活性突变体的筛选方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学技术领域,具体涉及一种人 α - 防御素抗病毒活性突变体的筛选方法。

背景技术

[0002] 当前社会,病毒感染性疾病十分常见且严重危害人类健康。现有的抗病毒药物主要包括传统广谱性抗病毒药和针对某些病毒的特效药。然而,传统抗病毒药常因为毒副作用大或疗效不显著等原因,使其应用受到限制;而那些通过抑制病毒专有酶或复制关键环节的抗病毒特效药,尽管早期应用时疗效突出,但由于作用于病毒上的靶点较为局限,所以在使用过程中容易出现因作用靶点突变而导致病毒耐药及停药后复发现象。因此,寻找高效、低毒且不易使病毒产生耐药的新型抗病毒药物,对病毒感染性疾病的防治具有重要意义。

[0003] 近年来,人们在研究哺乳动物、昆虫等防御和抵抗病原微生物侵袭及感染的过程中发现了一种内源性阳离子肽 - 防御素。有生物活性的成熟防御素分子一般在 3-6kD,除富含精氨酸外,其分子内还存在着 6 个保守半胱氨酸,形成 3 个链内二硫键。根据二硫键的组成方式,人体内的防御素又分为 α 和 β 两种主要类型,目前已发现的人 α 防御素共有 6 种,它们分别是由单核细胞表达分泌的 HNP-1、HNP-2、HNP-3、HNP-4 和由肠道潘氏细胞及生殖道粘膜上皮分泌的 HD5、HD6。由于防御素是一种内源性分子,本身具有识别病原微生物与机体正常细胞的能力,所以在有效剂量范围内不会对人体正常细胞产生毒性,而且病原体也很难对其产生耐药性。

[0004] 人们对防御素的最初认识是基于其显著、广谱的抗菌作用。但后来研究发现,除了抗菌活性外,大部分防御素还具有一定的抗病毒作用。然而,尽管许多防御素都显示出一定程度的抗病毒作用,但与抗菌作用相比,它们的抗病毒能力相对较弱。Tanabe 等 (Tanabe H et al, J Virol, 2004, 78 :11622-11631) 发现大部分 α 防御素抗病毒时的半数有效浓度 (IC₅₀) 要比抗菌时的 IC₅₀ 高 10 倍甚至上百倍以上。这就意味着当应用防御素进行抗病毒治疗时其用量要显著增加,如此不仅会加重病人的经济负担,更重要的是会超出人体正常细胞对它的耐受力,引发毒副反应。因此,若能显著提高防御素的抗病毒能力,将会进一步提升其在病毒感染防治中的应用价值。

[0005] 由于不同种类防御素的分子结构十分相似,尤其是半胱氨酸数目、位置以及精氨酸组成都显示出很强的保守性。因此,人们普遍认为所有哺乳动物的防御素都源自于相同的祖先,之所以出现不同种类、不同性状与功能的防御素是由于体内分子进化和选择的结果 (Partil A et al, Physiol Genomics, 2004, 20 :1-11)。有研究发现,当对一些防御素进行结构改变或氨基酸置换后,它们的生物学特性 (包括抗菌及抗病毒活性) 就会发生相应的变化 (Xie Cet al, J Bio Chem, 2005, 280 :32921-32929)。Lynn 等 (Lynn DJ et al, Mol Biol Evol, 2004, 21 :819-82) 在对人以及恒河猴、小鼠、大鼠等哺乳动物 α 防御素的进化情况进行分析时发现,在成熟人 α 防御素分子中有 14 个位置的氨基酸可以发生适应性进

化改变,也就是说,在不同环境和选择压力情况下这 14 个位置的氨基酸组成会产生相应改变,从而造就出不同生物学性状的 α 防御素。防御素之所以具有突出的抗菌活性,推测可能是在自然进化过程中其周围环境长期存在细菌压力作用的结果。相对而言,HSV、HPV、HIV 等病毒出现较晚,尚未对防御素进化产生长期、显著的环境压力,所以其抗病毒作用相对较弱。因此我们设想,如果对人 α 防御素分子中可适应性进化的氨基酸进行突变和抗病毒活性筛选,极有可能使其抗病毒能力得到进一步提高。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种人 α -防御素抗病毒活性突变体的筛选方法。所述方法通过突变与筛选,使人 α -防御素分子在保留其基本生物学特性的基础上,抗病毒能力显著提高,为寻找和研制高效、低毒抗病毒药物开辟一条新途径。

[0007] 本发明的技术方案:

[0008] 人 α -防御素抗病毒活性突变体的筛选方法,有以下步骤:

[0009] 1) 人 α -防御素突变体 cDNA 文库的构建:

[0010] A. 选择人 α -防御素分子中具有适应性进化潜能的氨基酸位点作为突变位点;

[0011] B. 通过 DNA 合成和 PCR 扩增获得编码人 α -防御素突变体的 cDNA 片段;

[0012] C. 构建含有人 α -防御素突变体 cDNA 片段的质粒文库;

[0013] 2) 人 α -防御素突变体在 CHO 细胞中的定点整合与均一性表达:

[0014] A. 特定 CHO 细胞的培养:

[0015] 复苏并传代培养染色体上带有 FRT 位点的 Flp-In-CHO 细胞;

[0016] B. 编码人 α -防御素突变体的 cDNA 在 CHO 细胞中的定点整合;

[0017] C. 表达人 α -防御素突变体的阳性细胞的筛选及单克隆化;

[0018] 3) 抗病毒活性筛选;

[0019] 4) 抗病毒活性显著增强的人 α -防御素突变体的生物学特性鉴定。

[0020] 所述的通过 DNA 合成和 PCR 扩增获得编码人 α -防御素突变体的 cDNA 片段,是指采用化学法合成在突变位点引入随机密码子序列的正、反义人 α -防御素分子的单链 DNA 片段,两条 DNA 片段之间存在至少 18bp 的互补交叉重叠区,然后以两条链退火、延伸后形成的双链 DNA 分子做为模板,再通过 PCR 扩增获得编码人 α -防御素突变体的 cDNA 片段。

[0021] 步骤 1) 所述构建含有人 α -防御素突变体 cDNA 片段的质粒文库,是指通过酶切、连接反应将编码人 α -防御素突变体的 cDNA 片段插入 pcDNA5/FRT 质粒载体中,转化大肠杆菌感受态细胞,获得 10^5 以上的阳性克隆,提取全部阳性克隆的质粒 DNA,即得人 α -防御素有效突变体 cDNA 文库。

[0022] 步骤 2) 所述的编码人 α -防御素突变体的 cDNA 在 CHO 细胞中的定点整合,是指将编码人 α -防御素突变体的 cDNA 片段定点插入到 CHO 细胞的 FRT 位点。

[0023] 步骤 2) 所述的阳性重组细胞的筛选与单克隆化,是指通过潮霉素 B 抗性筛选表达有人 α -防御素突变体的 CHO 细胞,并采用 ELISA 和 Western blot 对阳性细胞进行鉴定,再将潮霉素 B 抗性筛选出的阳性细胞接种至 96 孔板,进行单细胞培养 2-3 周。

[0024] 步骤 3) 所述的抗病毒活性筛选,是指将含有人 α -防御素突变体的 CHO 细胞上清与病毒液共同孵育 vero 细胞,通过分析 vero 细胞的保护率而筛选出抗病毒活性增强的人

α - 防御素突变体。

[0025] 步骤4)所述的抗病毒活性显著增强的人 α - 防御素突变体的生物学特性鉴定,包括 DNA 与氨基酸序列分析、细胞毒性分析和溶血性分析。

[0026] 本发明的优点:

[0027] 由于防御素分子相对较小,其中又必须有相对保守的半胱氨酸及精氨酸存在,因此应用基于“易错 PCR”或“有性 PCR”等方法的 DNA 改组技术很难产生有效突变体库。不过,也正是由于防御素具有上述特点,使其非常适用于寡核苷酸序列合成结合定点随机突变的方式产生有效突变体库:即对目的基因进行体外寡核苷酸分段或全长合成,合成过程中在可适应性进化的氨基酸位置引入随机密码子序列,再通过退火、延伸、扩增以及分子克隆构建成相应的肽库,达到一定容量的肽库中就会有各种形式供进化选择的突变体存在。除了需要构建有效的突变体库外,要真正得到高效抗病毒活性的突变体还必须有合适的表达筛选系统。由于防御素本身具有抗菌活性,不适合在大肠杆菌及噬菌体中进行表达及活性筛选,因此,最好是选用真核表达与筛选系统来实施。而位点特异性重组酶介导的真核细胞定点整合技术可以实现目的基因在真核细胞中的一致性表达,为类似防御素这样的基因功能筛选提供了切实可行的途径。

[0028] 人 α - 防御素是一种内源性阳离子肽,从生物学特性和作用机理来看,其本身就具有识别和选择性杀伤病原体的作用,而对正常人体细胞无明显影响。因此,通过对其分子中可适应性进化的氨基酸位点进行选择性突变和抗病毒活性筛选,最终所得到的高效抗病毒活性突变体理论上不会具有明显毒副作用,病毒也不会对其产生耐药,其在病毒感染防治方面将会具有广阔的应用前景。

[0029] 本发明基于人 α 防御素自身所具有的选择性进化特征,对其分子中特定位点的氨基酸进行随机突变和抗病毒活性筛选,旨在使人 α 防御素分子在保持其基本生物学性状的同时抗病毒活性得到显著提高,为寻找新型抗病毒药物奠定基础。

[0030] 本发明提供的人 α - 防御素抗病毒活性突变体筛选方法,同样适用于其他种类防御素和内源性抗菌肽的抗病毒活性突变体筛选。

附图说明

[0031] 图1为 m_1 HNP-1 突变体多肽在2%胎牛血清情况下抑制 HSV-2 感染 vero 细胞效果的分析,其中,柱状1代表正常细胞对照,2代表病毒对照,3代表 HNP-1 多肽对照,4代表 m_1 HNP-1 突变体多肽,* : $p < 0.01$ vs. 病毒对照 ;# : $p < 0.01$ vs. HNP-1 多肽对照 ;

[0032] 图2为 m_1 HD5 突变体多肽在2%血清条件下抑制 HSV-2 感染 vero 细胞效果的分析,其中,柱状1代表正常细胞对照,2代表病毒对照,3代表 HD5 多肽对照,4代表 m_1 HD5 突变体多肽,* : $p < 0.01$ vs. 病毒对照 ;# : $p < 0.01$ vs. HD5 多肽对照。

具体实施方式

[0033] 下面用实施例来进一步说明本方明的实质性内容,但本发明的内容并不局限于此。

[0034] 主要试剂和材料

[0035] 1. Pyrobest™ DNA Polymerase 试剂盒 (TaKara 公司产品,中国大连)

- [0036] 2. 限制性核酸内切酶 Hind III 和 Xho I (New England BioLabs 公司产品, 美国)
- [0037] 3. Flp-In™ 定点整合系统、Flp-In-CHO 细胞、质粒 pcDNA5/FRT 和 pOG44 (Invitrogen 公司产品, 美国)
- [0038] 4. CCK-8 细胞增殖 / 毒性检测试剂盒 (DOJINDO 公司产品, 日本)
- [0039] 5. 大肠杆菌 DH5 α (本室保存)
- [0040] 6. Vero 细胞株 (本室保存)
- [0041] 7. HSV-2 病毒株 (本室保存)
- [0042] 8. 氨苄青霉素、潮霉素 B (Roche 公司产品, 德国)
- [0043] 9. DMEM 培养基、胎牛血清 (Hyclone 公司产品, 美国)
- [0044] 10. 人 α -防御素 1 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司产品, 美国)
- [0045] 11. 人 α -防御素 5 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司产品, 美国)
- [0046] 实施例 1 人 α -防御素 1 抗病毒活性突变体的筛选
- [0047] (一) 人 α -防御素 1 突变体库的构建
- [0048] 1. 突变位点的选择:
- [0049] 人 α -防御素 1 氨基酸序列如下, 其中斜体部分为文献报道可发生适应性进化的 14 个氨基酸位点。
- [0050] *ACYCR I P A C I A G E R R Y G T C I Y Q G R L W A F C C*
- [0051] 1 5 10 15 20 25 30
- [0052] 考虑到精氨酸 (R) 在防御素分子中的特殊作用和实验的可实施性, 故选择这些可适应性进化氨基酸位点中的 9 个作为突变位点 (第 6、7、10、11、12、16、20、22、25 位氨基酸), 具体突变位点如下:
- [0053] *ACYCR I P AC I A G ERR Y GTC I Y Q GR L WAFCC*
- [0054] 1 5 10 15 20 25 30
- [0055] 在上述序列中, 斜体加下画线的氨基酸位点为人 α -防御素 1 的突变位点。
- [0056] 2. 含定点随机突变的人 α -防御素 1 的基因序列合成与扩增:
- [0057] 应用寡核苷酸合成技术对含定点随机突变的人 α -防御素 1 的基因序列进行体外合成, 合成方法如下:
- [0058] 1) 同时从人 α -防御素 1 基因的两端合成两段各长 67bp 的寡核苷酸序列, 两者之间存在一个 18bp 的互补交叉重叠区, 两段寡核苷酸序列的 5' 端分别引入 Hind III 和 Xho I 酶切位点及 4bp 的保护性碱基序列, 其中在 Hind III 酶切位点的后面引入翻译起始密码子序列, 在 Xho I 酶切位点的前面引入终止密码子序列; 合成过程中在可适应性进化的第 6、7、10、11、12、16、20、22、25 位氨基酸位点引入随机密码子序列, 随机密码子以 NNW 或 NNS 的形式合成, 其中 N 代表等摩尔的 4 种碱基, W 代表 A、T, 而 S 代表 C、G, 这种形式的密码子可以编码 20 种氨基酸。
- [0059] 所合成的两段 67bp 的寡核苷酸序列如下:
- [0060] H1-up:
- [0061] 5' - *AGGT* AAGCTT ATG GCCTGCTACTGCCGANNWNSGCCTGCNNSNNWNSGAACGACGANNW
GGAACA-3'
- [0062] 其中下画线部分为 Hind III 酶切位点序列, 加框部分为翻译起始密码子碱基序

列,斜体部分为保护性碱基。

[0063] H1-down :

[0064] 5' - *TGCG* CTCGAG **TCA** GCAGCAGAAGGCCCAWNNTCGTCCSNNGTAWNNGCATGTTCCSNNTCGTC GTTC-3'

[0065] 其中下画线部分为 Xho I 酶切位点序列,黑体部分为终止密码子碱基序列,斜体部分为保护性碱基。

[0066] 2) 将所合成的两段寡核苷酸进行退火与延伸反应,由于两者之间设置有 18bp 的互补交叉重叠区,所以经退火、延伸后即可生成含定点随机突变的人 α -防御素 1 全长双链 DNA。再以所生成的双链 DNA 为模板,以其最外侧端 22bp 序列为引物进行 PCR 扩增。PCR 引物序列如下:

[0067] P1 :5' - *AGGT* AAGCTT **ATG** GCCTGCTAC-3'

[0068] P2 :5' - *TGCC* CTCGAG **TCA** GCAGCAGAA-3'

[0069] 3. 编码定点随机突变的人 α -防御素 1cDNA 文库的构建:

[0070] 1) 将上步所得 PCR 产物及 Flp-In™ 定点整合表达质粒载体 pcDNA5/FRT (Invitrogen 公司产品) 用 Hind III 和 Xho I 进行双酶切;

[0071] 2) 胶回收目的 DNA 片段,并进行连接反应,连接产物采用电转化法转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经氨苄抗生素筛选获得重组子 pcDNA5/FRT/mHNP-1 (mHNP-1 指代人 α -防御素 1 突变体);

[0072] 3) 当阳性重组子数量达到 10^5 以上时,提取所有重组子质粒 DNA,即得人 α -防御素 1 有效突变体 cDNA 文库。

[0073] (二) 人 α -防御素 1 突变体在 CHO 细胞中的定点整合与表达

[0074] 1、特定 CHO 细胞的培养:

[0075] 复苏并传代培养 Flp-In-CHO 细胞(此细胞基因组中含有一个 FRT 位点),取 2-3 代的细胞进行后续实验。

[0076] 2、编码人 α -防御素 1 突变体的 cDNA 在 CHO 细胞中的定点整合:

[0077] 将质粒 pcDNA5/FRT/mHNP-1 与表达 Flp 重组酶的质粒 pOG44 按 1:9 的比例混匀,然后通过脂质体介导转染 Flp-In-CHO 细胞。转染后的 CHO 细胞在含有潮霉素 B 的培养基中进行培养。由于 pcDNA5/FRT 质粒载体中也存在一个 FRT 位点,因此在 Flp/FRT 点特异性同源重组酶系统介导反应下,经过重组和替换,pcDNA5/FRT 质粒的表达框架部分(其中包括 mHNP-1 以及潮霉素 B 抗性筛选基因等)就会定点插入到 CHO 细胞基因组的 FRT 位点中。

[0078] 3、表达人 α -防御素 1 突变体的阳性细胞的筛选与单克隆化:

[0079] 转染 24h 后,换用含有潮霉素 B 的选择性培养液,并于 96 孔板进行细胞单克隆化,由于只有阳性重组细胞内才有潮霉素 B 抗性筛选基因的表达,所以通过潮霉素 B 抗性筛选后继续生长的细胞即为阳性重组细胞。将阳性重组细胞在含潮霉素 B 的无血清培养基中继续 2-3 周,使之形成单克隆。

[0080] 4、人 α -防御素 1 突变体的表达鉴定:

[0081] 对于单克隆化的 CHO 细胞,取其无血清培养上清,应用人 α -防御素 1 单克隆抗体进行 Western blot 分析,对人 α -防御素 1 突变体的表达进行鉴定。之后,通过 ELISA 方法测定培养上清中人 α -防御素 1 突变体的表达量。

[0082] (三) 人 α -防御素 1 突变体抗病毒活性筛选

[0083] 1、病毒液制备：

[0084] 以 II 型单纯疱疹病毒 (HSV-2) 作为压力筛选的攻击者, 以 Vero 细胞 (非洲绿猴肾上皮细胞, 本室保存) 作为被攻击的对象。

[0085] 首先将 Vero 细胞复苏传代, HSV-2 病毒株 (国际标准株) 系列稀释后按常规方法感染单层培养的 Vero 细胞, 37°C 培养 72h, 观察细胞病变效应 (CPE), 并以引起 75% 细胞出现 CPE 的病毒液为其最佳使用剂量。

[0086] 2、抗病毒活性筛选：

[0087] 接种 Vero 细胞于 96 孔板中, 每组设置 5 个复孔, 在含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中 37°C 培养过夜, 使细胞完全贴壁, 更换 2% 胎牛血清培养液。取最佳使用剂量的病毒液, 与表达人 α -防御素 1 突变体的 CHO 单细胞克隆上清混合后加入培养有 Vero 细胞的 96 孔板中, 37°C 培养 48h。然后, 通过 CCK-8 法测定不同人 α -防御素 1 突变体对 Vero 细胞的保护率。具体操作如下: 每孔加入 CCK-8 反应液 10 μ l, 37°C 继续培养 4h, 轻轻吸弃上清液, 振荡混匀, 酶标仪测定 490nm 波长处吸光度值 (A 值)。细胞保护率 = (样品组 A 值 - 病毒对照组 A 值) / (正常细胞对照组 A 值 - 病毒对照组 A 值) \times 100%。细胞保护率值即可反映不同人 α -防御素 1 突变体的抗病毒活性强弱。

[0088] 3、抗病毒活性增强型人 α -防御素 1 突变体的鉴定：

[0089] 通过与正常人 α -防御素 1 相比, 最终筛选出 1 个抗病毒活性显著增强的人 α -防御素 1 突变体 (m_1 HNP-1, 图 1), 并将表达该突变体的 CHO 细胞放大培养, 然后收集细胞并提取细胞总 RNA, 反转录生成 cDNA, 前述 P1 和 P2 为引物, PCR 扩增获得 m_1 HNP-1 突变体的 cDNA 片段。对 PCR 产物进行测序, 获得 m_1 HNP-1 突变体的 DNA 序列, 其序列如下：

[0090] 5' - ATG GCCTGCTACTGCCGAATACCGGCCTGCATCGCAGGCGAACGACGATACGGAACATGCTTTT ACCGCGGACGACTTTGGGCCTTCTGCTGC TGA -3'

[0091] 然后, 根据 DNA 序列再推导出其相对应的氨基酸序列如下：

[0092] A C Y C R I P A C I A G E R R Y G T C F Y R G R L W A F C C

[0093] 经对比发现, m_1 HNP-1 是在正常 HNP-1 的基础上, 其第 20 位的异亮氨酸 (I) 突变为苯丙氨酸 (F)、第 22 位的天冬酰胺 (Q) 突变为精氨酸 (R)。

[0094] (四) 人 α -防御素 1 突变体多肽的细胞毒性鉴定

[0095] 1、人 α -防御素 1 突变体多肽的合成：

[0096] 根据上步实验所推导出的抗病毒活性显著增强型人 α -防御素 1 突变体 m_1 HNP-1 的氨基酸序列, 利用全自动多肽合成仪 (433A, Applied Biosystem) 委托上海生工生物工程有限公司合成该突变体多肽。

[0097] 2、细胞接种与培养：

[0098] 选择 vero 细胞 (非洲绿猴肾细胞) 为受试对象, 接种 vero 细胞于 96 孔板中, 接种密度为 2000 个细胞 / 孔, 接种体积为 100 μ l, vero 细胞在含 10% 胎牛血清的 1640 培养液中培养 24h 至细胞完全贴壁, 弃培养液, 换用含有不同浓度 m_1 HNP-1 多肽的培养液继续培养, 每一浓度均重复 5 孔, 同时设置正常人 α -防御素 1 多肽对照组和空白对照组。

[0099] 3、CCK-8 法测定人 α -防御素 1 突变体多肽的细胞毒性：

[0100] vero 细胞培养 72h 后, 每孔加入 CCK-8 反应液 10 μ l, 37°C 继续培养 4h, 轻轻吸弃

上清液,振荡混匀,酶标仪测定 490nm 波长处吸光度值(A 值),并计算出细胞存活率。细胞存活率(%)=样品组 A 值/空白对照组 A 值×100%。通过比较不同浓度正常人 α-防御素 1 多肽及其突变体 m₁HNP-1 作用后的细胞存活率,可以反应出 m₁HNP-1 多肽的细胞毒性是否增加。结果发现,与同等浓度的正常人 α-防御素 1 多肽相比, m₁HNP-1 的细胞毒性没有明显变化。

[0101] 实施例 2 人 α-防御素 5 抗病毒活性突变体的筛选

[0102] (一) 人 α-防御素 5 突变体库的构建:

[0103] 1. 突变位点的选择:

[0104] 人 α-防御素 5 氨基酸序列如下,其中斜体部分为文献报道可发生适应性进化的 14 个氨基酸位点。

[0105] A *T* CYCR *TGR* C *ATR* ESL *S* GVC *E* I *S* G *R* L Y *R* LCCR

[0106] 1 5 10 15 20 25 30

[0107] 考虑到精氨酸(R)在防御素分子中的特殊作用和突变体库的容量,故选择这些可适应性进化氨基酸位点中的 9 个作为突变位点(第 7、8、11、12、16、17、21、23、26 位氨基酸),具体突变位点如下:

[0108] ATCYCR *TG* RC *AT*. RES *LS* GVC *E* I *S* GR *L* YRLCCR

[0109] 1 5 10 15 20 25 30

[0110] 在上述序列中,斜体加下画线的氨基酸位点为人 α-防御素 5 的突变位点。

[0111] 2. 含定点随机突变的人 α-防御素 5 的基因序列合成与扩增:

[0112] 应用寡核苷酸合成技术对含定点随机突变的人 α-防御素的基因序列进行体外合成,合成方法如下:

[0113] 1) 同时从人 α-防御素 5 基因的两端合成两段各长 70bp 的寡核苷酸序列,两者之间存在一个 18bp 的互补交叉重叠区,两段寡核苷酸序列的 5' 端分别引入 Hind III 和 Xho I 酶切位点及 4bp 的保护性碱基序列,其中在 Hind III 酶切位点的后面引入翻译起始密码子序列,在 Xho I 酶切位点的前面引入终止密码子序列;合成过程中在可适应性进化的第 7、8、11、12、16、17、21、23、26 位氨基酸位点引入随机密码子序列,随机密码子以 NNW 或 NNS 的形式合成,其中 N 代表等摩尔的 4 种碱基, W 代表 A、T,而 S 代表 C、G,这种形式的密码子可以编码 20 种氨基酸。

[0114] 所合成的两段 70bp 的寡核苷酸序列如下:

[0115] H5-up:

[0116] 5' - *AGGT*. *AAGCTT* ATG GCCACCTGCTATTGCCGANNWNNSCGTTGTNNWNNSCGTGAGTCCNNW
NNSGGGGTG-3'

[0117] 其中下画线部分为 Hind III 酶切位点序列,加框部分为翻译起始密码子碱基序列,斜体部分为保护性碱基。

[0118] H5-down:

[0119] 5' - *TGCG*. *CTCGAG* **TCA** TCTACAACAGAGTCTGTASNNCGGCCWNNGATSNNACACACCCCWNNNS
NGGACTC-3'

[0120] 其中下画线部分为 Xho I 酶切位点序列,黑体部分为终止密码子碱基序列,斜体部分为保护性碱基。

[0121] 2) 将所合成的两段寡核苷酸进行退火与延伸反应,由于两者之间设置有 18bp 的互补交叉重叠区,所以经退火、延伸后即可生成含定点随机突变的人 α -防御素 5 全长双链 DNA。再以所生成的双链 DNA 为模板,以其最外侧端 22bp 序列为引物进行 PCR 扩增。PCR 引物序列如下:

[0122] P3 :5' - *AGGT* AAGCTT ATG GCCACCTGC-3'

[0123] P4 :5' - *TGCCA* CTCGAG TCA TCTACAACA-3'

[0124] 3. 编码定点随机突变的人 α -防御素 5cDNA 文库的构建:

[0125] 1) 将上步所得 PCR 产物及 Flp-In™ 定点整合表达质粒载体 pcDNA5/FRT (Invitrogen 公司产品) 用 Hind III 和 Xho I 进行双酶切;

[0126] 2) 胶回收目的 DNA 片段,并进行连接反应,连接产物采用电转化法转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经氨苄抗生素筛选获得重组子 pcDNA5/FRT/mHD-5 (mHD-5 指代人 α -防御素 5 突变体);

[0127] 3) 当阳性重组子数量达到 10^5 以上时,提取所有重组子质粒 DNA,即得人 α -防御素有效突变体 cDNA 文库。

[0128] (二) 人 α -防御素 5 突变体在 CHO 细胞中的定点整合与表达

[0129] 1、特定 CHO 细胞的培养:

[0130] 复苏并传代培养 Flp-In-CHO 细胞 (此细胞基因组中含有一个 FRT 位点),取 2-3 代的细胞进行后续实验。

[0131] 2、编码人 α -防御素 5 突变体的 cDNA 在 CHO 细胞中的定点整合:

[0132] 将质粒 pcDNA5/FRT/mHD-5 与表达 Flp 重组酶的质粒 pOG44 按 1 : 9 的比例混匀,然后通过脂质体介导转染 Flp-In-CHO 细胞。转染后的 CHO 细胞在含有潮霉素 B 的培养基中进行培养。由于 pcDNA5/FRT 质粒载体中也存在一个 FRT 位点,因此在 Flp/FRT 点特异性同源重组酶系统介导反应下,经过重组和替换,pcDNA5/FRT 质粒的表达框架部分 (其中包括 mHD-5 及潮霉素 B 抗性筛选基因等) 就会定点插入到 CHO 细胞基因组的 FRT 位点中。

[0133] 3、表达人 α -防御素 5 突变体的阳性细胞的筛选与单克隆化:

[0134] 转染 24h 后,换用含有潮霉素 B 的选择性培养液,并于 96 孔板进行细胞单克隆化,由于只有阳性重组细胞内才有潮霉素 B 抗性筛选基因的表达,所以通过潮霉素 B 抗性筛选后继续生长的细胞即为阳性重组细胞。将阳性重组细胞在含潮霉素 B 的无血清培养基中继续 2-3 周,使之形成单克隆。

[0135] 4、人 α -防御素 5 突变体的表达鉴定:

[0136] 对于单克隆化的 CHO 细胞,取其无血清培养上清,应用人 α -防御素 5 单克隆抗体进行 Western blot 分析,对人 α -防御素 5 突变体的表达进行鉴定。之后,通过 ELISA 方法测定培养上清中人 α -防御素 5 突变体的表达量。

[0137] (三) 人 α -防御素 5 突变体抗病毒活性筛选

[0138] 1、病毒液制备:

[0139] 以 I I 型单纯疱疹病毒 (HSV-2) 作为压力筛选的攻击者,以 Vero 细胞 (非洲绿猴肾上皮细胞,本室保存) 作为被攻击的对象。

[0140] 首先将 Vero 细胞复苏传代,HSV-2 病毒株 (国际标准株) 系列稀释后按常规方法

感染单层培养的 Vero 细胞, 37°C 培养 72h, 观察细胞病变效应 (CPE), 并以引起 75% 细胞出现 CPE 的病毒液为其最佳使用剂量。

[0141] 2、抗病毒活性筛选:

[0142] 接种 Vero 细胞于 96 孔板中, 每组设置 5 个复孔, 在含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中 37°C 培养过夜, 使细胞完全贴壁, 更换 2% 胎牛血清培养液。取最佳使用剂量的病毒液, 与表达人 α -防御素 5 突变体的 CHO 单细胞克隆上清混合后加入培养有 Vero 细胞的 96 孔板中, 37°C 培养 48h。然后, 通过 CCK-8 法测定不同人 α -防御素 5 突变体对 Vero 细胞的保护率。具体操作如下: 每孔加入 CCK-8 反应液 10 μ l, 37°C 继续培养 4h, 轻轻吸弃上清液, 振荡混匀, 酶标仪测定 490nm 波长处吸光度值 (A 值)。细胞保护率 = (样品组 A 值 - 病毒对照组 A 值) / (正常细胞对照组 A 值 - 病毒对照组 A 值) \times 100%。细胞保护率值即可反映不同人 α -防御素 5 突变体的抗病毒活性强弱。

[0143] 3、抗病毒活性增强型人 α -防御素 5 突变体的鉴定:

[0144] 通过与正常人 α -防御素相比, 筛选出 1 个抗病毒活性显著增强的人 α -防御素 5 突变体 (m_1 HD5, 图 2), 并将表达该突变体的 CHO 细胞放大培养, 然后收集细胞并提取细胞总 RNA, 反转录生成 cDNA, 选择前述 P3 和 P4 为引物, PCR 扩增获得人 α -防御素 5 突变体的 cDNA 片段。对 PCR 产物进行测序, 获得人 α -防御素 5 突变体的 DNA 序列, 其中 m_1 HD5 的序列如下:

[0145] 5' - ATG GCCACCTGCTATTGCCGAACAGGCCGTTGTGCAACGCGTGAGTCCCTTCCGGGGTGTGTC
GCATCTCAGGCCGCTCTACAGACTCTGTTGTAGA TGA -3'

[0146] 然后, 根据 DNA 序列再推导出其相对应的氨基酸序列如下:

[0147] A T C Y C R T G R C A T R E S L S G V C R I S G R L Y R L C C R

[0148] 经对比发现, m_1 HD5 是在天然 HD-5 的基础上, 其第 21 位的谷氨酸 (E) 突变位精氨酸 (R)。

[0149] (四) 人 α -防御素 5 突变体多肽的细胞毒性鉴定

[0150] 1、人 α -防御素 5 突变体多肽的合成:

[0151] 根据上步实验所推导出的抗病毒活性显著增强型 m_1 HD5 突变体的氨基酸序列, 利用全自动多肽合成仪 (433A, Applied Biosystem) 委托上海生工生物工程公司合成该突变体多肽。

[0152] 2、细胞接种与培养:

[0153] 选择 vero 细胞为受试对象, 接种 vero 细胞于 96 孔板中, 接种密度为 2000 个细胞 / 孔, 接种体积为 100 μ l, vero 细胞在含 10% 胎牛血清的 1640 培养液中培养 24h 至细胞完全贴壁, 弃培养液, 换用含有不同浓度 m_1 HD5 突变体多肽的培养液继续培养, 每一浓度均重复 5 孔, 同时设置正常人 α -防御素 5 多肽对照组和空白对照组。

[0154] 3、CCK-8 法测定 m_1 HD5 突变体多肽的细胞毒性:

[0155] vero 细胞培养 72h 后, 每孔加入 CCK-8 反应液 10 μ l, 37°C 继续培养 4h, 轻轻吸弃上清液, 振荡混匀, 酶标仪测定 490nm 波长处吸光度值 (A 值), 并计算出细胞存活率。细胞存活率 (%) = 样品组 A 值 / 空白对照组 A 值 \times 100%。通过比较不同浓度正常人 α -防御素 5 多肽及其突变体 m_1 HD5 作用后的细胞存活率, 可以反应出 m_1 HD5 多肽的细胞毒性是否增加。结果发现, 与同等浓度的正常人 α -防御素 5 多肽相比, m_1 HD5 的细胞毒性没有明显

变化。

[0156] 结论：本发明针对人 α -防御素具有可选择性进化的特性，通过定点随机突变及 Flp-In™ 介导真核细胞定点表达系统筛选抗病毒活性显著增强的人 α -防御突变体，得到突变体不仅具有高效抗病毒活性，同时还保持有人 α -防御素分子的基本特性，即无明显的毒副作用，病毒也不会对其产生耐药。因此，本发明为寻找高效、低毒抗病毒药物提供了一条新途径。

[0157] 虽然人 α -防御素共有 6 种，由于这 6 种人 α -防御素的分子结构特点一致，都具有可选择性进化特性，因此，本实施例所述的人 α -防御素 1、5 的突变体筛选方法，同样适用于其它几种人 α -防御素抗病毒活性突变体的筛选。

[0158] 序列表

[0159] <110> 中国人民解放军第三军医大学

[0160] <120> 人 α -防御素抗病毒活性突变体的筛选方法

[0161] <130>

[0162] <160>10

[0163] <170>PatentIn version 3.3

[0164] <210>1

[0165] <211>30

[0166] <212>PRT

[0167] <213> 人 α -防御素 1 氨基酸序列

[0168] <400>1

[0169] A C Y C R I P A C I A G E R R Y G T C I Y Q G R L W A F C C

[0170] 1 5 10 15 20 25 30

[0171] <210>2

[0172] <211>32

[0173] <212>PRT

[0174] <213> 人 α -防御素 5 氨基酸序列

[0175] <400>2

[0176] A T C Y C R T G R C A T R E S L S G V C E I S G R L Y R L C C R

[0177] 1 5 10 15 20 25 30

[0178] <210>3

[0179] <211>67

[0180] <212>DNA

[0181] <213> 含定点随机突变的人 α -防御素 1 的正义寡核苷酸序列 (H1-up)

[0182] 序列特征：5' 端带有 4bp 的保护性碱基和 Hind III 酶切位点序列，突变位点以 nnw 或 nns 的形式

[0183] 表示，其中 n 代表等摩尔的 4 种碱基，w 代表 a、t，而 s 代表 c、g。

[0184] <400>3

[0185] aggtaagctt atggcctgct actgccgann wnsngcctgc nnsnnwnsg aacgacgann 60

[0186] wggaaca 67

- [0187] <210>4
- [0188] <211>67
- [0189] <212>DNA
- [0190] <213> 含定点随机突变的人 α -防御素 1 的反义寡核苷酸序列 (H1-down)
- [0191] 序列特征 :5' 端带有 4bp 的保护性碱基和 Xho I 酶切位点序列, 突变位点以 wnn 或 snn 的形式表示,
- [0192] 其中 n 代表等摩尔的 4 种碱基, w 代表 a、t, 而 s 代表 c、g。
- [0193] <400>4
- [0194] tgcgctcgag tcagcagcag aaggcccawn ntcgtccsnn gtawnngcat gttccsntc 60
- [0195] gtcgttc 67
- [0196] <210>5
- [0197] <211>22
- [0198] <212>DNA
- [0199] <213> 人 α -防御素 1 突变体的上游 PCR 引物序列 (P1)
- [0200] <400>5
- [0201] aggtaagctt atggcctgct ac 22
- [0202] <210>6
- [0203] <211>22
- [0204] <212>DNA
- [0205] <213> 人 α -防御素 1 突变体的下游 PCR 引物序列 (P2)
- [0206] <400>6
- [0207] tgcgctcgag tcagcagcag aa 22
- [0208] <210>7
- [0209] <211>30
- [0210] <212>PRT
- [0211] <213> 人 α -防御素 1 突变体的氨基酸序列
- [0212] <400>7
- [0213] A C Y C R I P A C I A G E R R Y G T C F Y R G R L W A F C C
- [0214] 1 5 10 15 20 25 30
- [0215] <210>8
- [0216] <211>70
- [0217] <212>DNA
- [0218] <213> 含定点随机突变的人 α -防御素 5 的正义寡核苷酸序列 (H5-up)
- [0219] 序列特征 :5' 端带有 4bp 的保护性碱基和 Hind III 酶切位点序列, 突变位点以 nnw 或 nns 的形式表示,
- [0220] 其中 n 代表等摩尔的 4 种碱基, w 代表 a、t, 而 s 代表 c、g。
- [0221] <400>8
- [0222] aggtaagctt atggccacct gtattgccg annwnnscgt tgnnwnnsc gtgagtcenn 60
- [0223] wnnsggggtg 70

- [0224] <210>9
- [0225] <211>70
- [0226] <212>DNA
- [0227] <213> 含定点随机突变的人 α -防御素 5 的反义寡核苷酸序列 (H5-down)
- [0228] 序列特征 :5' 端带有 4bp 的保护性碱基和 Xho I 酶切位点序列, 突变位点以 wnn 或 snn 的形式表示,
- [0229] 其中 n 代表等摩尔的 4 种碱基, w 代表 a、t, 而 s 代表 c、g。
- [0230] <400>9
- [0231] tgcgctcgag tcatctacaa cagagtctgt asnngcggcc wngatsna cacacccwn 60
- [0232] nsnnggactc 70
- [0233] <210>10
- [0234] <211>22
- [0235] <212>DNA
- [0236] <213> 人 α -防御素 5 突变体的上游 PCR 引物序列 (P3)
- [0237] <400>10
- [0238] aggtaagctt atggccacct gc 22
- [0239] <210>11
- [0240] <211>22
- [0241] <212>DNA
- [0242] <213> 人 α -防御素 5 突变体的下游 PCR 引物序列 (P4)
- [0243] <400>11
- [0244] tgcgctcgag tcatctacaa ca 22
- [0245] <210>12
- [0246] <211>32
- [0247] <212>PRT
- [0248] <213> 人 α -防御素 5 突变体的氨基酸序列
- [0249] <400>31
- [0250] A T C Y C R T G R C A T R E S L S G V C R I S G R L Y R L C C R
- [0251] 1 5 10 15 20 25 30

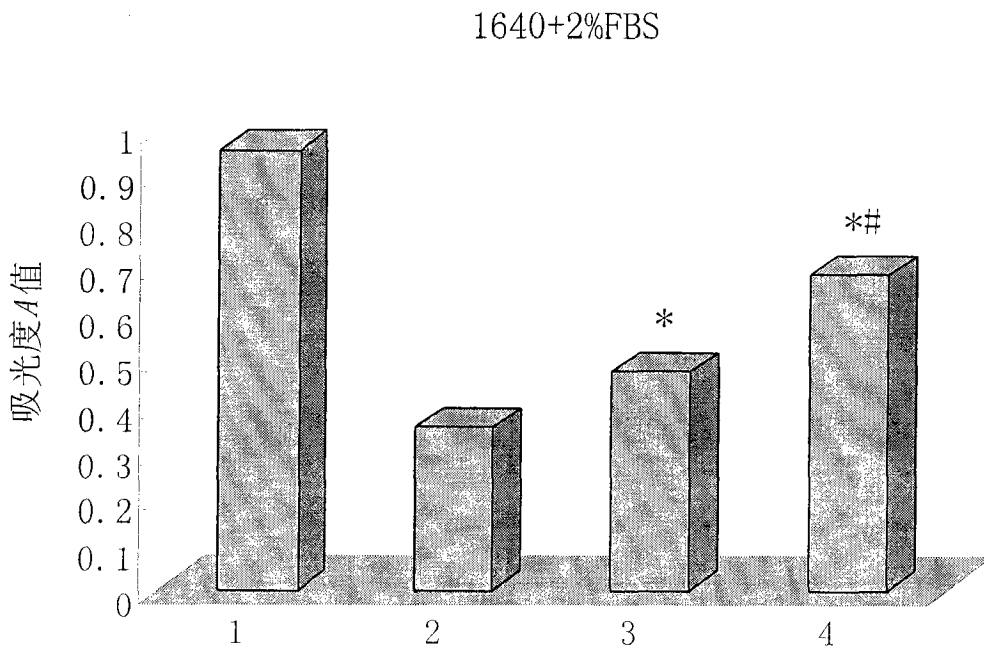


图 1

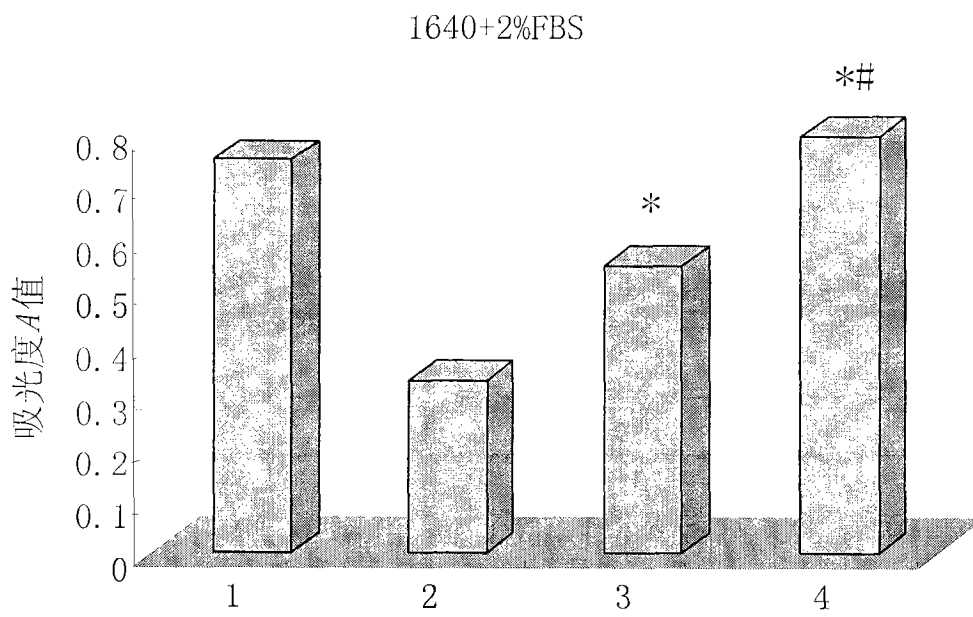


图 2

专利名称(译)	人 α -防御素抗病毒活性突变体的筛选方法		
公开(公告)号	CN101724633A	公开(公告)日	2010-06-09
申请号	CN200910191848.6	申请日	2009-12-10
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
[标]发明人	王军平 王艾平 陈芳 陈默 许杨 粟永萍 程天民		
发明人	王军平 王艾平 陈芳 陈默 许杨 粟永萍 程天民		
IPC分类号	C12N15/12 C12N15/85 C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种人 α -防御素抗病毒活性突变体的筛选方法，有以下步骤：人 α -防御素的定点随机突变、突变体库构建、突变体在CHO细胞中的定点整合与均一性表达，以及高效抗病毒活性突变体的筛选。本发明方法通过突变与筛选使人 α -防御素分子，在保留其基本生物学特性的基础上抗病毒能力显著提高，为寻找和研制高效、低毒抗病毒药物开辟一条新途径。

