

## 丙型肝炎病毒丝氨酸蛋白酶特异性结合肽的筛选和鉴定\*

杜桂鑫 侯利华 陈万荣 张永国 王海涛\*\*

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

**摘 要** 丙型肝炎病毒丝氨酸蛋白酶在病毒复制和包装中的重要作用使其成为特异性抗病毒药物研究的首选靶标。根据丝氨酸蛋白酶晶体结构特点,用柔性连接器连接 NS3 丝氨酸蛋白酶结构域和 NS4A 的核心序列,构建成单链丝氨酸蛋白酶基因并且在大肠杆菌中获得高水平的可溶性表达。纯化后的目的蛋白能够切割重组蛋白底物 NS5ab。随后,以单链丝氨酸蛋白酶为靶分子对噬菌体展示的随机十二肽库进行了三轮淘筛,挑选的 44 个克隆中有 37 个克隆能够特异性地结合丝氨酸蛋白酶,并且这种结合作用为竞争性 ELISA 试验结果所支持。对 13 个克隆进行序列测定,得到 6 种序列,它们在氨基酸组成上存在明显偏性,富含组氨酸和色氨酸,缺乏酸性氨基酸。6 种序列存在一个共有序列。

**关键词:** 丙型肝炎病毒,丝氨酸蛋白酶,噬菌体展示,肽库

中图分类号:R373 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)03-0298-07

丙型肝炎病毒(HCV)是导致输血后肝炎的主要病原,全球约有 1.7 亿感染者。尽管 HCV 感染后通常没有症状或者症状轻微,但 85% 的感染者将发展为各种临床结局的慢性肝炎。目前尚无有效的疫苗用来预防病毒的传播而且常用的  $\alpha$ -干扰素治疗效果也不理想,因此研制更为有效的抗病毒药物是丙型肝炎研究中亟待解决的问题之一<sup>[1]</sup>。HCV 的 NS3/4A 丝氨酸蛋白酶在结构上属于糜蛋白酶超家族成员,参与病毒多聚蛋白在 NS3-4A、NS4A-4B、NS4B-5A 和 NS5A-5B 位点的切割。由于丙型肝炎病毒的复制和多聚蛋白的加工是相偶联的过程,如果干扰丝氨酸蛋白酶的活性将破坏病毒的复制和成熟,从而实现抗病毒作用。因此,丙型肝炎病毒丝氨酸蛋白酶已经成为抗病毒药物研究的重要靶标<sup>[2]</sup>。

在 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂的研究工作中,除了合成化合物的筛选以及产物型抑制剂的优化外<sup>[3]</sup>,人们还尝试从生物分子组合库:如 minibody 库<sup>[4]</sup>、RNA aptamer 库<sup>[5]</sup>和骆驼化抗体库(camelized V(H) domain antibody)<sup>[6]</sup>中筛选抑制剂,并且取得了一些初步成果。90 年代初建立的噬菌体随机肽库技术,已被广泛应用在与分子识别相关的领域,极大地促进了小分子药物设计、抗病毒药物筛选、重组疫苗研制、蛋白结构解析以及表位分析等方面的发展,也成为药物开发的一个有力武器<sup>[7]</sup>。本研究中,我们基于 HCV 丝氨酸蛋白酶晶体结构的特点,构建了单链丝氨酸蛋白酶分子并在大肠杆菌中获得了可溶性表达,以该蛋白为靶分子,从噬菌体随机 12 肽库中筛选特异性结合肽,期望能够为蛋白酶抑制剂

\* 国家自然科学基金重点项目资助(39630020)

\*\* 联系人,参加工作还有刘树玲、孙大铭。

作者简介 杜桂鑫(1972-)男,北京房山人,军事医学科学院微生物流行病学研究所,博士学位,主要从事丙肝病毒分子生物学研究。

收稿日期 2001-07-23,修回日期 2001-12-12

的研制开辟一条新的途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒** :含有 HCV NS3 丝氨酸蛋白酶结构域基因的原核表达质粒 pGEX-3X-NS3N 本室构建并保存 ;带有 6 个组氨酸表达标签的原核表达载体 pQE30 购自德国 QIAGEN 公司 ;大肠杆菌 M15 [pREP ] :Na<sup>S</sup> Str<sup>S</sup> Rif<sup>S</sup> lac<sup>-</sup> ara<sup>-</sup> gal<sup>-</sup> mtl<sup>-</sup> F<sup>-</sup> recA<sup>+</sup> uvr<sup>+</sup> ,本室保存 ;缺陷型辅助噬菌体 M13K07 本室保存。

**1.1.2 试剂** :金属螯合亲和层析柱( Ni-NTA agrose )购自德国 QIAGEN 公司 ;PH. D. -12 噬菌体展示随机十二肽库试剂盒 购自 New England Biolabs 公司 ;HRP 标记的抗 M13 单克隆抗体 购自 Pharmacia 公司 ;重组蛋白底物 NS5ab 为本室制备并保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 单链丝氨酸蛋白酶基因的 PCR 组装** :表达质粒 pGEX-3X-NS3N 含有 HCV NS3 N 端 181 个氨基酸的编码基因 ,因酶切位点不适合 ,同时为了引入 NS4A 核心序列 ,设计 3 条引物用于丝氨酸蛋白酶基因的扩增和融合基因的组装。P1:5'-C GGATCC GGT TCT GTT GTT ATT GTT GTT AGA ATT ATT TTA TCT GGT-3' ;P2:5'-ATT ATT TTA TCT GGT AGT GGT AGT ATC ACG GCC TAC TCC CAA-3' ;P3:5'-CCC AAGCTT TTA GGA CCG CAT GGT AGT TTC-3'。( GGATCC ,*Bam*HI 切点 ;AAGCTT ,*Hind*III 切点 )其中 P2 和 P3 扩增 NS3 丝氨酸蛋白酶第 3 ~ 181 位氨基酸的编码基因 ,其扩增产物作为模板用 P1 和 P3 扩增即可获得 NS4A 核心序列与 NS3 丝氨酸蛋白酶序列相融合基因。

**1.2.2 重组表达质粒的构建与鉴定** :PCR 产物经玻璃粉回收后 ,*Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切 ,回收 ;与同样处理的表达载体 pQE30 连接 ,即构建成含有丝氨酸蛋白酶基因的重组表达质粒。重组质粒经酶切鉴定和序列测定后 ,命名为 pQENS3N4A。

**1.2.3 重组单链丝氨酸蛋白酶的表达和纯化** :阳性克隆在含抗生素的 LB 培养基( 氨苄青霉素 100mg/L ,卡那霉素 40mg/L )中 ,37℃ 培养至  $A_{600} = 0.8$  时 ,加入 IPTG 至终浓度 0.2mmol/L ,20℃ 诱导 6h 后收集菌体。加裂解缓冲液( 50mmol/L Tris·HCl pH7.4 ,100mL/L Glycerol ,0.3mol/L NaCl ,2mmol/L β-巯基乙醇 ,5mL/L NP-40 )重悬菌体并加入溶菌酶至终浓度为 1g/L ;冰浴 30min 后 ,超声裂解细菌( 150W × 1min × 10 次 ) ,4℃ 12 000r/min 离心 20min 弃去沉淀 ;上清用 0.22μm 微孔滤膜过滤后与 1mL 预先用裂解缓冲液平衡的 Ni-NTA agrose 混匀 ,4℃ 反应 1h ,使目的蛋白充分结合到柱基质上 ,装柱 ,然后以 10 个柱体积的裂解缓冲液、20 个柱体积缓冲液 W( 50mmol/L Tris·HCl pH7.4 ,100mL/L Glycerol ,1mol/L NaCl ,20mmol/L 咪唑 ,2mmol/L β-巯基乙醇 ,5mL/L NP-40 )洗去杂蛋白 ;用 5 个柱体积的缓冲液 K( 50 mmol/L Tris·HCl pH7.4 ,100mL/L Glycerol ,1mol/L NaCl ,250mmol/L 咪唑 ,2mmol/L β-巯基乙醇 ,5mL/L NP-40 )洗脱目的蛋白并分步收集。取各管洗脱液 30μL ,加入等量的 2 × 上样缓冲液 ,加热后进行 15% SDS-PAGE 电泳 ,将含有目的蛋白的各管合并 ,然后对透析缓冲液 D( 50mmol/L Tris·HCl pH7.4 ,100mL/L Glycerol ,1mol/L NaCl ,2mmol/L β-巯基乙醇 ,5mL/L NP-40 )进行透析( 5h × 3 次 ) ,最后以紫外吸收法测定蛋白含量 :蛋白质浓度( g/L ) =  $1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}$ 。

**1.2.4 丝氨酸蛋白酶体外切割活性测定**:100 $\mu$ L 反应体系中含有重组单链丝氨酸蛋白酶 20 $\mu$ g,重组蛋白底物 NS5ab20 $\mu$ g,25mmol/L Tris·HCl pH7.4,100mL/L Glycerol,0.5mol/L NaCl,10mmol/L DTT,5mL/L NP-40,室温反应不同时间;酶反应结束后,立即加入等体积的2 $\times$ 电泳上样缓冲液,90 $^{\circ}$ C 100min 灭活,进行 SDS-PAGE 电泳。

**1.2.5 单链丝氨酸蛋白酶特异性结合肽的筛选**:以包被液(0.1mol/L NaHCO<sub>3</sub> pH8.6,150mmol/L NaCl)调整纯化后的单链丝氨酸蛋白酶至 100mg/L,加入该蛋白至酶联板中(150 $\mu$ L/孔)4 $^{\circ}$ C包被过夜。次日吸去包被蛋白液,加入满孔封闭液(5g/L BSA,0.1mol/L NaHCO<sub>3</sub> pH8.6),4 $^{\circ}$ C 封闭 1h;TBS-0.1% Tween 20 洗板 6 次,加入 100 $\mu$ L TBST 稀释的  $1 \times 10^{11}$  噬菌体,室温结合 2h,TBS-0.1% Tween 20 洗板 10 次,洗去非特异性结合噬菌体,然后加入 100 $\mu$ L 0.2mol/L 甘氨酸·HCl(pH2.2),温和振荡 10min,洗脱特异性结合的噬菌体,用 18 $\mu$ L 1mol/L Tris·HCl(pH9.1)中和,取少量噬菌体进行滴度测定,其余部分立即加入到 20mL 对数生长期的宿主菌 ER2738,37 $^{\circ}$ C 孵育 4.5h,使特异性噬菌体得到扩增。以 PEG/NaCl 沉淀噬菌体,在 LB/IPTG/X-gal 平板上测定扩增后的噬菌体滴度,完成第一轮筛选。以同样的方法进行三轮筛选,取第三轮的洗脱噬菌体进行特异性鉴定和序列测定。

**1.2.6 间接 ELISA 法鉴定噬菌体肽的特异性结合作用**:第三轮筛选结束后,挑选 44 个分隔良好的蓝色噬斑,分别接种对数生长期 ER2738 中,37 $^{\circ}$ C 孵育 4.5h,离心取上清即为单克隆的噬菌体肽。在 96 孔酶联板上包被单链丝氨酸蛋白酶和对照蛋白 NS5ab,100ng/孔,4 $^{\circ}$ C 包被过夜,5% BSA-TBS 4 $^{\circ}$ C 封闭 2h 后,加入用稀释液(20g/L BSA,TBS,5mL/L Tween20,500mmol/L NaCl)对倍稀释的噬菌体上清,37 $^{\circ}$ C 反应 1h,PBST(5mL/L Tween-20)洗板后,加入 100 $\mu$ L 用稀释液稀释的 HRP/鼠抗 M13 噬菌体单抗。37 $^{\circ}$ C 反应 1h,PBST 洗板后,加入底物 TMB,室温显色 5min,测定  $A_{450}$  值。

**1.2.7 竞争性 ELISA 法鉴定噬菌体肽的特异性结合作用**:挑取 13 个  $A_{450}$  值较高的噬菌体克隆进行竞争性 ELISA 试验。按照间接 ELISA 试验的方法进行抗原包被和封闭,PBST 洗板后加入对倍稀释的噬菌体上清以及过量的单链丝氨酸蛋白酶(终浓度为 100mg/L)或者重组蛋白 NS5ab(阴性对照),37 $^{\circ}$ C 反应 1h 后,进行二抗孵育和底物显色,测定  $A_{450}$  值,根据公式计算抑制率:抑制率=(未竞争  $A_{450}$  值 - 竞争  $A_{450}$  值)/未竞争  $A_{450}$  值  $\times 100\%$ 。

**1.2.8 特异性结合肽的序列测定和分析**:将 4 $^{\circ}$ C 贮存的阳性噬菌体克隆接种于 ER2738,37 $^{\circ}$ C 培养 4.5h,10 000r/min 离心 10min,将上清转移至一新的微量离心管中,加入 200 $\mu$ L PEG/NaCl,充分混匀,室温放置 10min,10 000r/min 离心 10min,弃上清,再次短暂离心,吸去上清,用 100 $\mu$ L NaI 缓冲液重悬沉淀,加入 250 $\mu$ L 无水乙醇,室温放置 10min,10 000r/min 离心 10min,弃上清,用 70% 乙醇洗涤沉淀一次,室温风干,用 30 $\mu$ L TE 缓冲液溶解沉淀,紫外定量后,用 -96 gIII 测序引物,在自动测序仪 ABI PRISM<sup>TM</sup> 377 上进行序列测定。测定结果用 DNASTAR<sup>®</sup> 软件包进行序列对齐比较。

## 2 结果

### 2.1 单链丝氨酸蛋白酶基因的 PCR 组装和克隆

根据丙型肝炎病毒 NS3 丝氨酸蛋白酶晶体结构特点,拟将辅因子 NS4A 的核心序列

(21~32位)通过柔性连接子(GSGS)融合到NS3丝氨酸蛋白酶结构域(3~181位)的氨基端,从而使NS4A和NS3分子间的相互作用转变为分子内相互作用。设计三条引物,通过两次PCR扩增组装成单链丝氨酸蛋白酶的基因,其策略见图1。

## 2.2 单链丝氨酸蛋白酶的表达和纯化

重组表达载体经酶切和序列测定,证实氨基酸序列以及阅读框架完全正确,用于表达研究。从SDS-PAGE结果可见阳性克隆在23kD位置出现一条强的表达带,紫外扫描分析显示,其含量约占菌体总蛋白的35%。可溶性分析表明,融合蛋白有较大比例以可溶形式存在(图2);由于蛋白氨基端融合了6个组氨酸的表达标签,因此可以采用金属螯合亲和层析法进行纯化。经过细菌培养、裂解、吸附、洗涤、洗脱和透析等步骤,最终从500mL培养物中获得7.5mg纯蛋白,薄层扫描分析其纯度可达95%以上(图略)。

## 2.3 纯化蛋白的体外切割活性测定

丙型肝炎病毒丝氨酸蛋白酶在体内具有反式切割NS4A/B、NS4B/5A和NS5A/B连接点的功能;在体外,也可以反式切割含有上述3种切割位点的合成肽或者重组蛋白。在获得纯化的重组丝氨酸蛋白酶的基础上,我们建立了体外切割系统用于评价丝氨酸蛋白酶的切割活性。该系统所采用的底物是原核表达的重组蛋白NS5ab,它涵盖了丙型肝炎病毒NS5A羧基端和NS5B氨基端序列,将适量的底物与前面纯化的单链丝氨酸蛋白酶混合,室温反应不同的时间后取样,进行SDS-PAGE电泳。从图3可以看出,蛋白底物NS5ab能够被表达的单链丝氨酸蛋白酶切割成分子量为24kD和12kD的两条带,而且随着反应时间延长,底物逐渐减少,产物的量逐渐增加,表明单链丝氨酸蛋白酶确实具有较好的酶学活性。

## 2.4 间接ELISA法和竞争性ELISA法鉴定噬菌体结合肽的特异性结合作用

以纯化的单链丝氨酸蛋白酶为靶分子筛选噬菌体随机12肽库。从第三轮洗脱噬菌体中随机挑取了44个克隆,用间接ELISA方法比较它们和单链丝氨酸蛋白酶的结合能力,结果有37个克隆能够特异性地结合靶蛋白,而不和对照蛋白NS5ab反应,并且作为阴性对照的辅助性噬菌体M13K07和空白对照BSA的 $A_{450}$ 值也很低(未给出),表明这些噬菌体的反应是特异性地针对单链丝氨酸蛋白酶的。

为了进一步确定所得到的噬菌体与单链丝氨酸蛋白酶之间的作用是特异性的,挑选13个克隆进行竞争性ELISA实验。从图4可以看出过量的游离的单链丝氨酸蛋白酶确

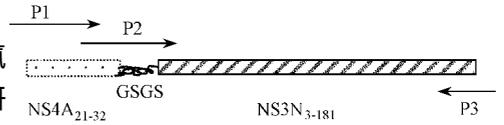


图1 单链型丝氨酸蛋白酶构建示意图

Fig.1 Assembly strategy of single-chain serine protease

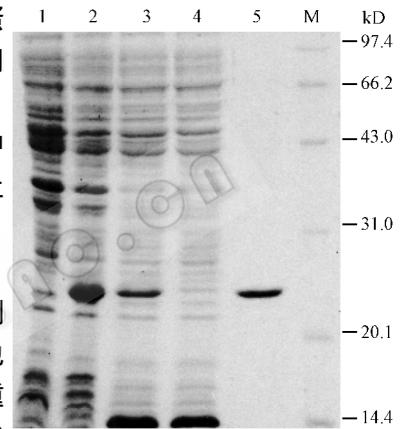


图2 单链型丝氨酸蛋白酶表达和纯化分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis for the expression and purification of single-chain serine protease 1. Noninduced cells; 2. Cells induced with IPTG; 3. Cleared lysate; 4. Flow-through; 5. Purified single-chain serine protease; M. Low molecular weight markers.

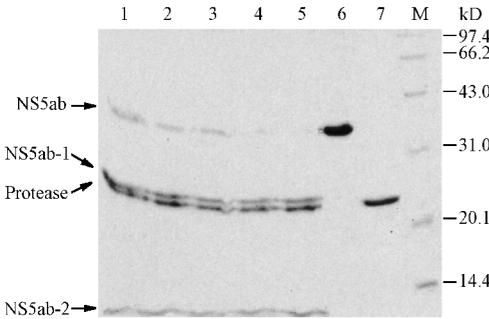


图3 单链型丝氨酸蛋白酶的体外切割活性实验

Fig.3 The in vitro cleavage activity of single-chain serine protease

1~5. Cleavage reaction after 10, 20, 30, 45 and 60mins ;  
6. Protein substrate NS5ab ;7. Single-chain serine protease ;M. Low molecular weight markers .

实能够抑制噬菌体肽与固相化的丝氨酸蛋白酶结合,而无蛋白不具有这种作用,表明噬菌体肽与丝氨酸蛋白酶之间的相互作用的确是一种特异性结合反应。

### 2.5 噬菌体肽的序列分析

对上述 13 个克隆进行序列测定,根据核苷酸序列推导出 12 肽的氨基酸序列并分析其氨基酸组成和序列对齐情况。结果 13 个克隆代表了 6 种氨基酸序列(图 5);在全部的 13 个克隆中氨基酸的组成存在明显偏性,和原始肽库的氨基酸组成相比,有如下特点(1)结合肽中酸性氨基酸(D、E 和 Q)的比率明显降低,而碱性的氨基酸(H 和 K)的比率明显增加(2)色氨酸(W)的比率显著高于其他氨基酸,占到全部的 18.5%。

利用 DNASTar<sup>®</sup>软件包中的 MagAlign<sup>®</sup>程序进行对齐比较,结果 6 种序列存在一个明显的共有序列 [H/F/W]-H-W-X-X-W。(图 5)

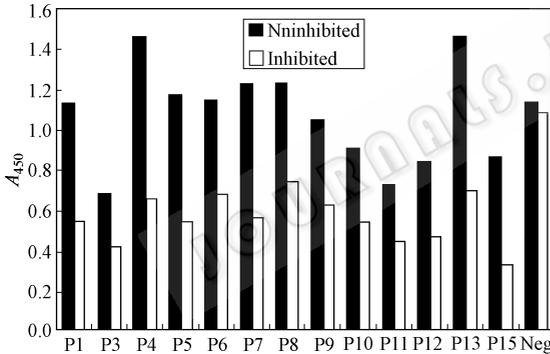


图4 竞争抑制性 ELISA 鉴定特异性结合肽

Fig.4 Competitive inhibition ELISA of positive phage clones Negative :Recombinant protein NS5ab

P4/P13	YWPSKHWWLAP
P10/P15	HHWHQVLTNFSL
P12	HFWYPWTQSNPW
P11	FHWSWYTPSRPS
P1 / P5 / P6 / P7 / P8 / P9	WHWTNWGKTSPA
P3	SHWWWDTRGYD
Consensus sequence	[H/F/W]HW--W

图5 特异性结合噬菌体的氨基酸序列对齐比较

Fig.5 The multiple alignment of amino acids sequences of positive phages

## 3 讨论

动力学和结构学研究都表明单独的丙型肝炎病毒丝氨酸蛋白酶结构域的酶活性是不完全的,仅仅能够以极低的效率切割 NS5A/B 连接点,而对其他三个位点没有活性;在掺入 NS4A 辅因子后不仅能够在所有位点进行切割,而且在 NS5A/B 连接点的切割效率也有显著的提高<sup>[8]</sup>。为了获得具有完全活性的丝氨酸蛋白酶,通常的作法是,先在大肠杆菌中单独表达丝氨酸蛋白酶结构域,随后与过量的 NS4A 核心序列的合成肽在体外温育,形成异源二聚体<sup>[9]</sup>,这种方法的优点是周期短,成本低,然而其不足之处在于,得到的酶分子活性较低。观察 HCV NS3 丝氨酸蛋白酶结构域和 NS4A 合成肽复合物的晶体结构<sup>[10]</sup>,可以看出,NS4A 蛋白的核心肽的羟基端在空间上靠近蛋白酶的氨基端,这表明有可能借助适

当的柔性连接了把 NS4A 核心序列的羟基端和 NS3 丝氨酸蛋白酶的氨基端连接起来,使 NS4A 和 NS3N 之间原有的分子间作用变成分子内作用。根据这种想法,我们设计了 3 条引物,通过两轮 PCR 扩增可以组装成单链丝氨酸蛋白酶融合分子。经条件优化,可以实现该分子在原核细胞中的可溶性表达;利用 pQE30 表达系统中的组氨酸纯化标签,经过一步纯化,可以获得大量的单链丝氨酸蛋白酶纯品。活性分析实验证实这种单链丝氨酸蛋白酶具有良好的体外切割活性,表明此种融合方式是合理的,而且也说明其氨基端融合的 6 个组氨酸标签未影响蛋白酶的活性。

随机肽库技术作为研究生物分子间相互作用的重要工具,近年来被广泛用于抗体、受体、酶学等领域的研究<sup>[11]</sup>。已经有多篇文献报道从随机肽库中成功筛选到酶的抑制剂或者激活剂,如 Lazarus<sup>[12]</sup>等人从肽库筛选到一个凝血因子 VIIa 的结合肽 [E-76],动力学分析表明它能够非竞争性地抑制凝血因子中的丝氨酸蛋白酶活性,而许正平等<sup>[13]</sup>从噬菌体 15 肽库筛选到 16 个豆蔻酰转移酶的抑制肽。因此,在成功表达了具有良好活性的 HCV 丝氨酸蛋白酶的基础上,我们以该蛋白酶为靶分子对噬菌体随机 12 肽库进行了三轮筛选,希望得到一批特异性结合酶的噬菌体肽,甚至是抑制性肽。结果,随机挑选的 13 阳性克隆能够被游离的丝氨酸蛋白酶抑制,它们的序列在氨基酸组成上具有明显的偏性:色氨酸和组氨酸高频出现,而酸性氨基酸鲜见。还不知道这种偏性在生物学上的意义,不过类似的情况在一些以酶作为靶分子筛选肽库的文章中也有报道。如 MuKhija<sup>[14]</sup>筛选的 21 个对细菌的磷酸烯醇丙酮酸-糖磷酸转移酶具有抑制作用的噬菌体肽也是富含组氨酸而缺乏酸性氨基酸,Hyde-DeRuyscler<sup>[15]</sup>等人用 7 类不同的酶筛选得到的大量特异性结合肽又普遍存在高比例的色氨酸。因此,推测这种氨基酸组成上的偏性是由筛选所致。经过对齐比较,可确定一个共有序列 [H/F/W]-H-W-X-X-W,其中 H 和 W 是高度保守的。较高的出现频率和较高的保守性提示,这些氨基酸可能在噬菌体肽与靶分子结合中起关键作用。

下一步,我们准备采用合成肽以及融合表达肽等方式对这六种结合肽进行功能测定,在分析其生物学活性的基础上可以构建限制性肽库进行序列优化,以期获得能够抑制 HCV 丝氨酸蛋白酶的肽类分子。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Lindsay K L. *Hepatology*, 1997, **26**( S1 ):71S~77S.
- [ 2 ] Bartenschlager R. *J Viral Hepat*, 1999, **6**( 3 ):165~181.
- [ 3 ] Kakiuchi N, Komoda Y, Komoda K, et al. *FEBS Lett*, 1998, **421**( 3 ):217~220.
- [ 4 ] Dimasi N, Martin F, Volpari C, et al. *J. Virol*, 1997, **71**( 10 ):7461~7469.
- [ 5 ] Urvil P T, Kakiuchi N, Zhou D M, et al. *Eur J Biochem*, 1997, **248**( 1 ):130~138.
- [ 6 ] Martin F, Volpari C, Steinkuhler C, et al. *Protein Eng*, 1997, **10**( 5 ):607~614.
- [ 7 ] Cortese R, Monaci P, Luzzago A, et al. *Current Opinion in Biotechnology*, 1996, **7**:616~621.
- [ 8 ] Tanji Y, Hijikata M, Satoh S. *J Virol*, 1995, **69**:1575~1581.
- [ 9 ] Vishnuvardhan D, Kakiuchi N, Urvil PT, et al. *FEBS Lett*, 1997, **402**( 2~3 ):209~212.
- [ 10 ] Kim J L, Morgenstern K A, Lin C, et al. *Cell*, 1996, **87**:343~355.
- [ 11 ] Rodi D J, Makowski L. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, **10**:87~93.
- [ 12 ] Dennis M S, Eigenbrot C, Skelton N J, et al. *Nature*, 2000, **404**:465~470. 期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [ 13 ] Xu Z P , Duan Z J , Chen H , *et al.* *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* ,1998 **30** ( 2 ) :154 ~ 158 .  
 [ 14 ] Mukhija S , Ermi B. *Mol Microbiol* ,1997 **25** ( 6 ) :1159 ~ 1166 .  
 [ 15 ] Hyde-DeRuyscher R , Paige L A , Christensen D J , *et al.* *Chem Biol* 2000 **7** :17 ~ 25 .

## Selection and Characterization of Peptides That Specifically Binding to Hepatitis C Virus Serine Protease\*

Du Guixin   Hou Lihua   Chen Wanrong   Zhang Yongguo   Wang Haitao\*\*

( *Department of Applied Molecular Biology , Beijing Institute of Microbiology & Epidemiology , Beijing 100071 , China* )

**Abstract** : The HCV NS3 serine protease that plays important role in the processing of polyprotein and the replication of virus is a prime target for antiviral drugs and therapy research. Based on the crystallographic structure of HCV serine protease , a single-chain protease was constructed in which the central sequence of NS4A was fused to the N-terminus of NS3 serine protease domain via a flexible linker and it was expressed at high level in soluble form in *E. coli* . The purified protease could cleave the recombinant protein NS5ab into two parts. The purified protease was used as target to screen binding peptides from phage displayed peptide library. After three rounds of affinity screening , 37 out of 44 randomly selected phages could bind specifically with the single-chain serine protease and their specificity were verified by competitive ELISA. The 13 sequenced clones represents 6 kinds of sequences of which the amino acids composition is in bias and there is a consensus sequence [ H/F/W ]- H - W - X - X - W .

**Key words** : HCV , Serine protease , Phage display , Peptide library

\* This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China ( 39630020 )

\*\* To whom correspondence should be addressed

## 《微生物学报》第七届编辑委员会名单

顾 问	张树政									
主 编	李季伦									
副主编	陆德如	朱关福	李阜棣	王敖全	谭华荣					
编 委	王修垣	邓子新	田 波	刘志恒	朱庆裴	孙志浩	李焕萎			
	陈世平	陈永青	杨苏声	周培瑾	范云六	范孝用	钱新民			
	钱世钧	诸葛健	徐怀恕	翟中和						