

# 人类免疫缺陷病毒 (HIV-1) 整合酶抑制剂筛选及其活性测定 \*

邹 媛 詹金彪 \*\*

(浙江大学医学院生物化学与遗传学系, 杭州 310058)

**摘要** 整合酶作用的病毒 DNA 整合进宿主 DNA 的过程是反转录病毒在宿主细胞中增殖的关键步骤. 由于在正常人类细胞中不存在相似的功能蛋白, 其抑制剂对人体的副作用可能很小, 相对于经典 AIDS 治疗药物的毒副作用, 整合酶抑制剂理论上要具有优势. 在线性七肽库中筛选与整合酶有特异结合作用的噬菌体展示肽, 选取 TPSHSSR 和 HPERATL 2 条肽, 它们可以竞争性地抑制展示相应肽段的噬菌体与整合酶的结合, 同时它们对整合酶的整合活性也有一定程度的抑制, 半数抑制率分别为  $IC_{50}=(54.56 \pm 5.18) \mu\text{mol/L}$ ,  $IC_{50}=(28.29 \pm 1.32) \mu\text{mol/L}$ . 这些多肽可用于治疗艾滋病新药的开发应用及整合酶结构及作用机制的研究.

**关键词** 人类免疫缺陷病毒 (HIV-1) 整合酶, 抑制剂, 七肽, 噬菌体展示

**学科分类号** Q812, R978.7

病毒 DNA 整合进入宿主细胞染色体 DNA 的过程是反转录病毒生活周期中极其重要的一个环节, 在这一环节中起关键作用的便是整合酶 (integrase, IN). 过去, 经典的艾滋病 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) 的治疗药物包括: 核苷类反转录酶抑制剂, 非核苷类反转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂<sup>[1]</sup>. 但是人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的高突变性对这 3 类药物产生明显的耐药性, 而且长期使用这 3 类药物还会有贫血、嗜中性粒细胞减少、肌病、外周神经疾病等副作用的产生<sup>[2]</sup>. 因此, 为了克服 AIDS 治疗中存在的问题, 人们开始寻求作用于新的靶分子药物, 抑制反转录病毒整合的药物应运而生了. 由于人类细胞中没有与整合酶同源的功能蛋白, 因此该酶的抑制剂对人体毒害性可能很小<sup>[3]</sup>, 整合酶抑制剂成为治疗 AIDS 极具潜力的药物. 在过去的十几年中, 已有各类整合酶抑制剂被发现和合成<sup>[4]</sup>, 我们利用噬菌体展示技术, 在线性七肽库中筛选到了能与克隆表达产生的整合酶特异结合的短肽. 对能够特异结合的噬菌体进行测序, 并合成相应的七肽. 合成的肽序列具有抑制相应的阳性克隆噬菌体与整合酶结合及抑制整合酶活性的作用.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

重组表达质粒 PT7-7-His-TX-WT-IN 由美国 UCLA Dr. Chow 实验室提供; 线性七肽库购自 New England Biolabs 公司 (USA); HRP/anti-M13 购自 Amersham Pharmacia Biotech Inc.; Streptavidin-HRP 购自武汉博士德公司; pBluescript SK(+) 质粒本实验室保存; 寡核苷酸链由上海生工生物技术公司合成, 序列如下: 1, 5' biotin-GTGTGGAAAA-TCTCTAGCAGT 3'; 2, 5' ACTGCTAGAGATTTT-CCACAC 3'; 3, 5' TGCTAGTTCTAGCAGGCCCC-TTGGGCCGCGCTTGCGCC 3'.

### 1.2 方法

**1.2.1 整合酶的表达与纯化.** 将转化有质粒 PT7-7-His-TX-WT-IN 的 *E.coli* BL21(DE3) 菌接种于含有氨苄青霉素 Amp (终浓度为 100 mg/L) LB 培养基中, 37°C 振荡培养过夜. 将培养物 1:100 稀释培

\*国家自然科学基金资助项目 (30670424).

\*\* 通讯联系人. Tel: 0571-88208273, E-mail: jzhan2k@zju.edu.cn

收稿日期: 2007-01-30, 接受日期: 2007-03-30

养 3 h 左右, 使其  $A_{600}$  值达到 0.6~0.8. 加入 1 mol/L 的 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 30℃诱导表达 5 h. 6 000 r/min, 4℃离心 15 min, 收集菌体. 将菌体重悬于缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.9, 0.5 mol/L NaCl, 10%甘油, 2 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇)中, 并加入终浓度为 2 mmol/L PMSF, 0.2 g/L 溶菌酶, 0.02 g/L DNase I. 4℃冰浴 30 min 后超声破碎 25 min. 15 000 r/min, 4℃离心 20 min, 收集上清.

装好 Ni-NTA 柱, 用缓冲液 A 平衡过夜. 取上清过柱, 分别用含 0 mmol/L, 40 mmol/L, 80 mmol/L, 200 mmol/L 咪唑的缓冲液 A 进行梯度洗脱, 收集含 200 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱下的溶液, 用 12% SDS-PAGE 鉴定条带及纯度. 用缓冲液 B (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.9, 0.5 mol/L NaCl, 10%甘油, 1 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT)透析收集的洗脱产物, 4℃透析过夜. 用蔗糖干粉浓缩至原体积的 1/3 左右. 测定蛋白质浓度并过 0.22  $\mu$ m 的微孔滤膜除菌, 分装保存于-20℃.

**1.2.2 整合酶活性实验.** 整合酶活性检测采用的是一种非放射性的类似于 ELISA 方法<sup>[5,6]</sup>. 首先将质粒 pBluescript SK(+) 用 *Sma* I 30℃酶切过夜, 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收酶切产物, 并溶解于包被液(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 20 mmol/L EDTA, 2 mol/L NaCl)中, DNA 终浓度为 2 mg/L, 用其包被 96 孔板, 100  $\mu$ l/孔, 37℃包被 2 h, 或 4℃包被过夜. 供体 DNA 是由 2 条单链寡核苷酸链 VU5BR (5' biotin-GTGTGGAAAATCTCTAGCAGT 3') 和 VU5 (5' ACTGCTAGAGATTTTCCACAC 3') 退火而成<sup>[7]</sup>. 将包被好的 96 孔板用蒸馏水洗 3 次, 2.5% BSA 37℃封闭 3 h, 0.1% PBST 洗 3 次. 每孔加反应混合物 (20 mmol/L HEPES pH 7.5, 10 mmol/L  $MnCl_2$ , 10 mmol/L  $MgCl_2$ , 30 mmol/L NaCl, 10 mmol/L DTT, 0.05% NP-40, 100 mg/L BSA, 5 nmol/L VU5/VU5BR, 2.5~80 nmol/L 不同浓度的整合酶)100  $\mu$ l; 37℃孵育 1 h. 0.1% PBST 洗 3 次, 每孔加 100  $\mu$ l 链亲和素标记的辣根过氧化物酶 (1:3000, 0.1% BSA+0.025% PBST 稀释) 溶液, 37℃孵育 1 h. 0.1% PBST 洗 3 次, 加 TMB 100  $\mu$ l/孔, 37℃放置 20~30 min, 加 50  $\mu$ l/孔 2 mol/L  $H_2SO_4$ , 450 nm 波长下检测吸光度.

**1.2.3 筛选噬菌体肽库中与整合酶特异结合的多肽.** 将纯化好的整合酶包被 96 孔板, 100  $\mu$ l/孔(包被液 0.1 mol/L  $NaHCO_3$  pH 9.2, 蛋白质浓度 20 mg/L),

4℃过夜. 5% BSA 封闭 2 h, 0.1% TBST 洗 6 次. 加入 100  $\mu$ l/孔 适当稀释的肽库扩增液, 室温结合 1 h, 0.05% TBST 洗 6 次. 100  $\mu$ l/孔 0.2 mol/L 甘氨酸-HCl pH 2.2 洗脱结合的噬菌体, 室温洗脱 7 min, 15  $\mu$ l/孔 1 mol/L Tris-HCl pH 9.1 中和, 收集洗出液. 取 1  $\mu$ l 洗出液, 10 倍梯度稀释后转染 ER2738, 涂含 IPTG/Xgal 的 LB 平板, 测滴度 (output), 其余的转染 ER2738 进行扩增, 进入下一轮筛选. 每轮筛选的洗涤力度依次加强, 但 Tween-20 不超过 0.5%. 通过每一轮的结合、洗脱、测滴度、扩增, 观察富集情况. 经过 4~5 轮筛选, 挑取清晰的蓝斑转染宿主, 制备噬菌体原液, 用于阳性克隆的检测.

**1.2.4 用 ELISA 检测阳性克隆.** 包被整合酶, 100  $\mu$ l/孔, 4℃过夜. 5% BSA 室温封闭 2 h, 0.1% TBST 洗涤 6 次, 每个噬菌体克隆用 0.05% TBST 适当稀释, 100  $\mu$ l/孔, 室温结合 1 h (同时包被 BSA 作为对照, 空白对照不加噬菌体, 其余不变). 0.1% TBST 洗涤 6 次, 加 HRP 标记的抗 M13 抗体 (1:5 000 稀释) 100  $\mu$ l/孔, 室温孵育 1 h, TBST 洗涤后加 100  $\mu$ l TMB 显色, 黑暗环境下放置 30 min, 加 2 mol/L  $H_2SO_4$  终止显色, 450 nm 测 A 值.

**1.2.5 阳性克隆的测序.** 扩增阳性克隆, 并按《分子克隆实验指南》中的方法抽提 M13 噬菌体的单链 DNA, 以 -96 通用引物 (5' GCCCTCATTAGCGTAACG 3') 为引物进行测序. 测序工作由上海生工生物技术公司完成.

**1.2.6 合成七肽的竞争抑制 ELISA 实验.** 用 100  $\mu$ l/孔的整合酶包被 96 孔板, 4℃过夜, 5% BSA 37℃封闭 2 h. 用不同浓度的肽与相应的一定量噬菌体竞争结合包被的整合酶. 方法同 1.2.4 用 ELISA 检测阳性克隆实验, 只是结合的溶液由单一的噬菌体变为噬菌体与相对应肽的不同浓度混合液. 计算出噬菌体结合率: 结合率% =  $1 - (A_{450} - A'_{450}) / A_{450} \times 100\%$ , 其中  $A_{450}$  为未加抑制剂时的 450 nm 波长下吸光度,  $A'_{450}$  为加入抑制剂后的 450 nm 波长下吸光度.

**1.2.7 整合酶整合及去整合活性抑制实验.** 抑制整合活性实验方法与整合活性检测方法类似. 在反应混合物 (20 mmol/L HEPES pH 7.5, 10 mmol/L  $MnCl_2$ , 10 mmol/L  $MgCl_2$ , 30 mmol/L NaCl, 10 mmol/L DTT, 0.05% NP-40, 100 mg/L BSA, 320 nmol/L 整合酶) 中加入不同浓度的合成肽, 37℃先温育 20 min, 再加入 500 pmol/L

VU5/VU5BR, 100 μl/ 孔, 37℃ 反应 1 h. 其余步骤见 1.2.2 整合作用实验.

在去整合活性抑制实验中, 首先 38-mer 的寡核苷酸链 (5' TGCTAGTTCTAGCAGGCCCTT-GGGCCGGCGCTTGCGCC 3') 自身退火形成一个“哑铃型”结构<sup>[7]</sup>. 在反应混合物中不同浓度的合成肽先和 320 nmol/L 整合酶预反应 20 min, 再加入 1 μmol/L 哑铃型底物. 37℃ 反应 1 h 后, 产物用 20% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离. 经银染后观察哑铃型底物含量的改变.

2 结 果

2.1 整合酶的活性检测

整合酶活性的检测采用非放射性类似于 ELISA 的方法, 以 5 nmol/L VU5/VU5BR 为底物; 用 2.5、5、10、20、40 和 80 nmol/L 不同浓度的整合酶反应, 当整合酶浓度达到 40 nmol/L 左右时, 活性曲线趋向于平坦, 表示酶已达到饱和状态(图 1).

2.2 噬菌体的筛选及鉴定

经过 5 轮的吸附 - 洗脱 - 扩增, 和整合酶特异结合的展示噬菌体得到了富集(表 1). 第 5 轮比第 1 轮, 富集了 700 倍.

经 5 轮筛选后, 挑取清晰的蓝斑扩增噬菌体, 用 ELISA 方法进行检测, 同时设置 BSA 对照及空白对照. 以空白孔调零, 包被整合酶比包被 BSA 孔的 A 值高出 0.5 以上的视为阳性克隆. 从中筛选出了 13 个克隆, 其中 1~4 号阳性现象极为显著, A 值是其 BSA 对照的 2 倍以上(图 2).

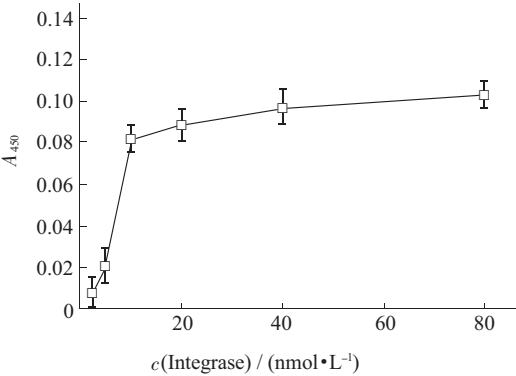


Fig. 1 The integrase activity curve

The integrase activity was assayed using HIV-1 integrase (2.5 ~ 80 nmol/L) and 5 nmol/L biotin-labeled donor DNA substrate (VU5/VU5BR). Incubation was done in 37℃ for 1 h using the indicated amount of integrase. Each point represents ( $\bar{x} \pm s$ ) of three measurements.

Table 1 Recovery rate of phage clones during panning

| Round | Phage titer(input)   | Phage titer(output) | Rate(output/input)   |
|-------|----------------------|---------------------|----------------------|
| 1     | $2.0 \times 10^{12}$ | $2.0 \times 10^5$   | $1.0 \times 10^{-7}$ |
| 2     | $1.4 \times 10^{11}$ | $1.6 \times 10^5$   | $1.1 \times 10^{-6}$ |
| 3     | $6.0 \times 10^{11}$ | $9.0 \times 10^5$   | $1.5 \times 10^{-6}$ |
| 4     | $4.0 \times 10^{11}$ | $1.0 \times 10^6$   | $2.5 \times 10^{-6}$ |
| 5     | $1.0 \times 10^{11}$ | $7.0 \times 10^6$   | $7.0 \times 10^{-5}$ |

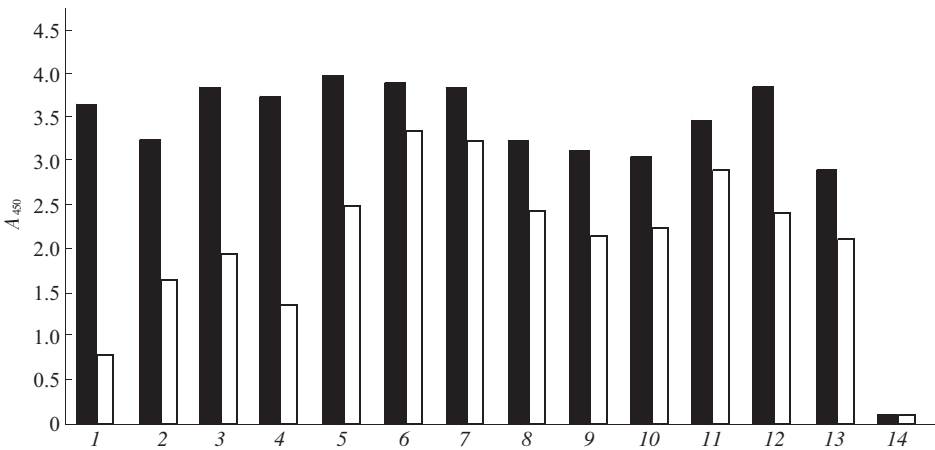


Fig. 2 Assaying selected peptides for target binding by ELISA

1~13: Numbers of positive colony; 14: Blank control. Every sample is measured three times, every A in the figure is the average. ■: Coated with IN; □: Coated with BSA.

## 2.3 测序结果

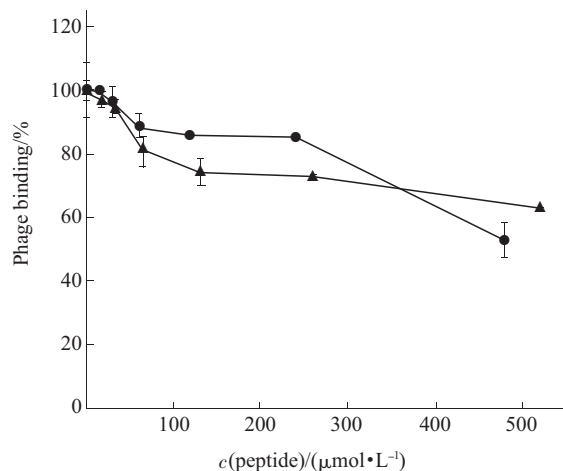
将筛选出的 13 个克隆抽提的 DNA 送上海生物工程技术有限公司测序, 得到 7 条序列. 从 DNA 序列推导得到其氨基酸序列. 其中 2 号和 6 号肽的前 3 个氨基酸一致, 4 号和 7 号肽的 1、2 和第 4 个氨基酸一致, 并且 7 条肽序列中, 大部分都含有组氨酸, 精氨酸, 脯氨酸和丝氨酸 (表 2).

**Table 2 Amino acid sequences of phage-displayed heptamer peptide**

| Peptide number | Amino acid sequence | Colony number | Screening rate /% |
|----------------|---------------------|---------------|-------------------|
| 1              | K K M K R R K       | 1             | 7.69              |
| 2              | T P S H S S R       | 2,4           | 15.38             |
| 3              | H P E R A T L       | 3,5,6,7,13    | 38.46             |
| 4              | S H L G P R R       | 8             | 7.69              |
| 5              | P V R P F A L       | 9,11          | 15.38             |
| 6              | T P S A W T Q       | 10            | 7.69              |
| 7              | S H S G W S E       | 12            | 7.69              |

## 2.4 竞争 ELISA 实验结果

从 7 条多肽中选取 2, 3 号 2 条合成肽. 将 0, 16.25, 32.5, 65, 130, 260, 520  $\mu\text{mol/L}$  不同浓度的 TPSHSSR; 0, 15, 30, 60, 120, 240, 480  $\mu\text{mol/L}$  不同浓度的 HPERATL 与一定滴度的展示相应七肽的噬菌体混合, 与包被的整合酶竞争结合. 随着加入七肽的增加, 噬菌体的结合率逐渐下降 (图 3).

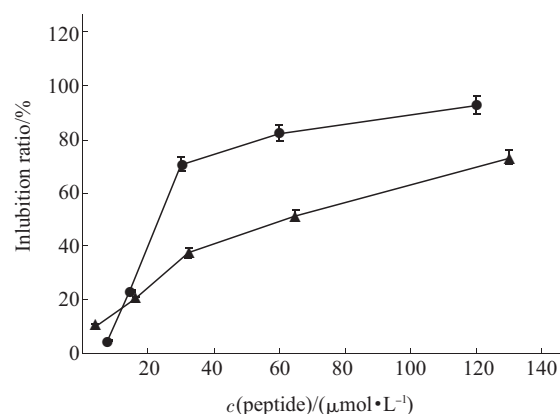


**Fig. 3 Competitive ELISA assay**

Competitive ELISA was performed as a usual ELISA assay expect that the selected phage was preincubated with the corresponding synthetic peptide before addition to the IN-coated wells. Increasing concentrations of peptides were used as indicated in the figure. Competition assay with the TPSHSSR-displaying clone and HPERATL-displaying clone.  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ : TPSHSSR-displaying clone;  $\bullet$ — $\bullet$ : HPERATL-displaying clone.

## 2.5 整合酶活性抑制实验

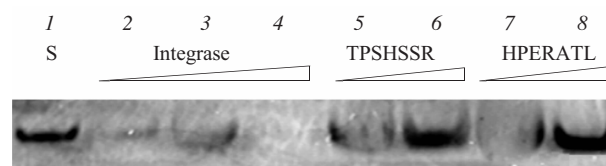
整合酶对于不同的底物具有整合和去整合 2 种作用. 在含有 500 pmol/L VU5/VU5BR, 320 nmol/L 的反应体系中加入 0, 4, 16.25, 32.5, 65, 130  $\mu\text{mol/L}$  不同浓度的 TPSHSSR 和 0, 7.5, 15, 30, 60, 120  $\mu\text{mol/L}$  不同浓度的 HPERATL, 分析七肽对整合酶蛋白整合活性的抑制作用 (图 4). 经 SPSS 统计软件计算, 得到  $IC_{50}(\text{TPSHSSR}) = (54.56 \pm 5.18) \mu\text{mol/L}$ ,  $IC_{50}(\text{HPERATL}) = (28.29 \pm 1.32) \mu\text{mol/L}$ .



**Fig. 4 Effect of selected peptides on in vitro integrase activities**

Integrase assay were done in the presence of synthetic heptamer peptide using 320 nmol/L integrase, 500 pmol/L biotin-labeled substrate (VU5/VU5BR) and incubated in 37°C for 1 h. The percentage of inhibition was calculated as:  $(A - B)/A \times 100\%$ , where  $A$  and  $B$  are the absorbance readings in the absence and presence of heptamer peptide (TPSHSSR or HPERATL), respectively.  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ : TPSHSSR;  $\bullet$ — $\bullet$ : HPERATL.

在去整合抑制活性实验中, 1  $\mu\text{mol/L}$  哑铃型底物与 320 nmol/L 整合酶预反应后, 分别与 1.3、2.6 mmol/L TPSHSSR 和 1.2、2.4 mmol/L HPERATL 反应 (图 5). 由图 5 可见: 随着合成肽浓



**Fig. 5 Effect of selected peptides on disintegration activity of IN**

Lane 1 (S) corresponds to the substrate only. Lane 2~4: Reaction mixture contained 1  $\mu\text{mol/L}$  of the "dumbbell" substrate and 80 nmol/L, 320 nmol/L and 640 nmol/L IN respectively, without peptides. Lane 5~8: Reaction mixture contained 320 nmol/L IN and 1.3 mmol/L, 2.6 mmol/L TPSHSSR and 1.2 mmol/L, 2.4 mmol/L HPERATL, respectively. After preincubating at 37°C for 20 min, 1  $\mu\text{mol/L}$  of the "dumbbell" substrate was added. Products were separated on a 20% polyacrylamide gel and followed by processing silver-stained reaction.

度的增加, 被酶切的哑铃型底物减少. 也就是说, 整合酶的去整合活性降低.

### 3 讨 论

整合酶抑制剂是令人瞩目的用于抗艾滋病治疗的一类新药<sup>[8]</sup>, 尽管目前还没有这类新药批准上市, 但在美国已有 2 种药物处于临床试验中. HIV-1DNA 的整合作用机制<sup>[9,10]</sup>, 整合酶的结构<sup>[11-14]</sup>及药物作用的可能靶位点<sup>[15]</sup>都有可能成为今后研究的热点. 由于整合酶在逆转录病毒的复制周期中起关键作用, 同时在人类细胞中又没有相似的功能蛋白, 其抑制剂可能对人体没有什么毒害性, 因此可能会成为理想的人体治疗药物, 有较高的开发前景.

本实验利用噬菌体展示技术, 利用酸洗脱法, 经过 5 轮的筛选富集, 从线性七肽库中筛选到了 7 条能与整合酶蛋白特异结合的多肽. 其中有 2 条七肽的前 3 个氨基酸均为 TPS, 有 2 条七肽的第 1, 2 和第 4 个氨基酸均为 SH 和 G. 在这些七肽中大部分都含有组氨酸, 精氨酸, 脯氨酸和丝氨酸, 其中有 5 条是含有精氨酸, 含有组氨酸、脯氨酸和丝氨酸的分别有 4 条.

选取其中含有 TPS 的 1 条多肽和克隆重复率较高的 1 条多肽, 进行化学合成. 将这 2 条多肽与展示相应肽段的噬菌体混合, 竞争结合包被着的整合酶. 随着加入的合成七肽浓度的增加, 噬菌体的结合率明显下降, 说明这 2 条肽与整合酶的亲合性相对较好.

整合活性实验采用类似于 ELISA 的检测方法, 是针对整合酶具有将线性的病毒 DNA 双链各自 3'末端的 2 个核苷酸 (GT) 切除 (3'末端切除/3'加工), 并将缺少 2 个核苷酸的 3'-OH 通过酯交换反应整合进宿主 (即目的) DNA 的作用 (链转移反应)<sup>[16]</sup>. 所以该实验方法对整合酶活性的检测, 反映的是整合酶对 3'末端切除和链转移反应两者共同的作用活性. 由于这 2 条肽对整合酶的抑制作用实验原理与整合酶活性检测的原理相同, 所以其反应的抑制作用只能说明这 2 条肽对整合酶的整合过程有抑制作用, 至于对 3'末端切除和链转移作用两者中的哪个有抑制作用, 本实验并不能体现出来.

在细胞外实验中, 重组整合酶还具有去整合活性, 是链转移反应的逆反应过程<sup>[17,18]</sup>. 本实验去整合实验中的哑铃型底物是病毒 DNA 双链整合进宿主 DNA 后形成的“Y”型中间体的模拟物, 能被整

合酶识别并进行酶切<sup>[17,19]</sup>. 产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 哑铃型底物量会随着整合酶活性的升高而减少. 值得一提的是, 整合酶要具有整合活性, 必须具有核心结构域(催化结构域)、N 端和 C 端结构域, 而去整合作用只要有核心结构存在便可以了<sup>[20]</sup>. 本实验显示, 合成的 2 条七肽 TPSHSSR 和 HPERATL 既具有抑制整合的作用, 又能抑制去整合. 那么, 这 2 条多肽很有可能作用在整合酶的核心结构.

实验中合成的多肽能够抑制 HIV-1 整合酶活性, 中断病毒 DNA 在宿主细胞中的增殖, 从而有望用于艾滋病治疗药物的研究工作. 此外, 还可用于整合酶的结构、作用机制等研究, 具有相当广泛的应用前景.

### 参 考 文 献

- 1 Clercq E D. New developments in anti-HIV chemotherapy. *Biochem Biophys Acta*, 2002, **1587** (2~3): 258~275
- 2 Kaufmann G R, Cooper D A. Antiretroviral therapy of HIV-1 infection: established treatment strategies and new therapeutic options. *Curr Opin Microbiol*, 2000, **3** (5): 508~514
- 3 Semenova E A, Gashnikova N M, Il'ina T V, *et al.* Characterization of recombinant integrase of human immunodeficiency virus type 1 (isolate Bru). *Biochemistry*, 2003, **68** (9): 1208~1215
- 4 Akimov D V, Filimonov D A, Poroikov V V. Integrase inhibitors: possible future of anti-HIV/AIDS therapy (a review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2002, **36** (11): 575~580
- 5 Chang Y C, Ching T T, Syu W J. Assaying the activity of HIV-1 integrase with DNA-coated plates. *J Virol Methods*, 1996, **59** (1~2): 135~140
- 6 Au T K, Collins R A, Lam T L, *et al.* The plant ribosome inactivating proteins luffin and saporin are potent inhibitors of HIV integrase. *FEBS Lett*, 2000, **471** (2~3): 169~172
- 7 Chow S A. *In vitro* assays for activities of retroviral integrase. *Methods*, 1997, **12** (4): 306~317
- 8 Maurin C, Bailly F, Cotellet F. Structure-activity relationships of HIV-1 integrase inhibitors-enzyme-ligand interactions. *Curr Med Chem*, 2003, **10** (18): 1795~1810
- 9 Roe T, Chow S A, Brown P O. 3'-end processing and kinetics of 5'-end joining during retroviral integration *in vivo*. *J Virol*, 1997, **71** (2): 1334~1340
- 10 Lin M, Craigie R. Processing of viral DNA ends channels the HIV-1 integration reaction to concerted integration. *J Biol Chem*, 2005, **280** (32): 29334~29339
- 11 Zheng R, Jenkins T M, Craigie R. Zinc fold the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(24): 13659~13664
- 12 Gerton J L, Brown P O. The core domain of HIV-1 integrase recognizes key features of its DNA substrates. *J Biol Chem*, 1997,

- 272 (41): 25809~25815
- 13 Dirac A M G, Kjems J. Mapping DNA-binding sites of HIV-1 integrase by protein footprinting. *Eur J Biochem*, 2001, **268** (3): 743~751
- 14 Wielens J, Crosby I T, Chalmers D K. A three-dimensional model of the human immunodeficiency virus type 1 integration complex. *J Comput Aid Mol Des*, 2005, **19** (5): 301~317
- 15 Shkriabai N, Patil S S, Hess S, *et al.* Identification of an inhibitor-binding site to HIV-1 integrase with affinity acetylation and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (18): 6894~6899
- 16 Kawasuji T, Fuji M, Yoshinaga T, *et al.* A platform for designing HIV integrase inhibitors. Part 2: A two-metal binding model as a potential mechanism of HIV integrase inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2006, **14** (24): 8420~8429
- 17 Diamond T L, Bushman F D. Division of labor within human immunodeficiency virus integrase complexes: determinants of catalysis and target DNA capture. *J Virol*, 2005, **79** (24): 15376~15387
- 18 Ellison V, Gerton J, Vincent K A, *et al.* An essential interaction between distinct domains of HIV-1 integrase mediates assembly of the active multimer. *J Biochem*, 1995, **270** (7): 3320~3326
- 19 Chow S A, Brown P O. Substrate features important for recognition and catalysis by human immunodeficiency virus type 1 integrase identified by using novel DNA substrates. *J Virol*, 1994, **68** (6): 3896~3907
- 20 Craigie R. HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics. *J Biol Chem*, 2001, **276** (26): 23213~23216

## Screening and Identification of Inhibitors on HIV-1 Integrase\*

ZOU Yuan, ZHAN Jin-Biao\*\*

(Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract** Integration is a critical step in the retroviral life cycle. HIV-1 integrase is involved in the integration of HIV DNA into host chromosomal DNA and appears to have no functionally equivalent in human cells. It has become an attractive and rational target for selective anti-AIDS therapy. A random linear heptapeptides phage display library was panned on the recombinant HIV-1 integrase protein. After five rounds of panning, 13 positive phage clones were selected and sequenced. Two consensus peptides (TPSHSSR and HPERATL) were chemically synthesized. The non-radioactive ELISA-based HIV-1 integrase assay showed that the synthetic peptides TPSHSSR and HPERATL were able to inhibit the 3'cleavage or strand transfer activity of HIV-1 integrase to some extent ( $IC_{50}=(54.56\pm 5.18) \mu\text{mol/L}$ ,  $IC_{50}=(28.29\pm 1.32) \mu\text{mol/L}$ , respectively). These heptapeptides could be used for developing new anti-HIV drug candidates, as well as for structural studies of the three-dimensional structure of the entire integrase molecule.

**Key words** human immunity deficiency virus (HIV-1) integrase, inhibitors, heptapeptides, phage display

\*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30670424).

\*\*Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-88208273, E-mail: jzhan2k @ zju.edu.cn

Received: January 30, 2007 Accepted: March 30, 2007