

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_

学号: 21620141152587

UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

以肠道病毒 71 型 3C<sup>pro</sup> 及

柯萨奇 B3 型 3D<sup>pol</sup> 结构为基础的药物开发

Structure-based Drug Design Targeting Enterovirus 71 3C<sup>pro</sup>

and Coxsackievirus B3 3D<sup>pol</sup>

周婷

指导教师姓名: 林天伟 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2017 年 4 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月

学位授予日期: 2017 年 5 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2017 年 5 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

## 摘要

本论文中，以结构为基础的药物开发包括两个靶点：1) 肠道病毒 71 型 3C 蛋白酶；2) 柯萨奇病毒 B3 型 3D 聚合酶。

1. 手足口病 (HFMD) 是一种全球性传染病，该病是由肠道病毒引起的。近年来在中国的发病率显著升高。引起手足口病的病原体中肠道病毒 71 型 (EV71) 是最主要的，它能够引起神经系统并发症，导致严重的后遗症，甚至导致死亡，是致死率较高、传染性相对最强的肠道病毒，因此对其治疗和预防药物的研究越来越重要。

3C (3C protease, 3C<sup>pro</sup>) 蛋白酶在 EV71 病毒蛋白的成熟过程中起着关键作用，3C 蛋白酶还能作用于宿主细胞内的多种转录因子以及细胞因子，抑制宿主细胞本身蛋白的表达，从而破坏宿主的免疫机制，此外 3C 蛋白酶还具有 RNA 结合活性，在病毒的复制中起作用。因此，3C 蛋白酶是抗 EV71 特效药物设计和开发的重要靶点之一。

本课题中，我们对实验室的小分子药物库中的一部分小分子进行了筛选。通过分子克隆、蛋白表达和纯化、结晶、soaking 以及 X 射线衍射和结构解析的方法解析了 3C 蛋白酶和小分子片断的复合物结构，并找到了结合在 3C 蛋白酶 RNA 结合区域的小分子片断，为后面基于片断的药物设计打下了基础。

2. 病毒性心肌炎 (Viral myocarditis, VMC) 是病毒感染心肌细胞引起的，目前国内 VMC 的病死率均呈上升趋势，临床表现轻重不一。其中柯萨奇病毒 B3 型 (CVB3) 是导致病毒性心肌炎的主要致病原，此外，CVB3 可诱导人类胰岛胰岛 $\beta$ -细胞的损伤或死亡，因此被认为与 I 型青少年糖尿病或胰岛素依赖型糖尿病有关。因此对其治疗和预防药物研究的重要性日渐突显。

3D 聚合酶 (3D polymerase, 3D<sup>pol</sup>) 是 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRP) 是 RNA 病毒生命周期的核心组成部分。3D<sup>pol</sup> 负责初始负链和随后的正链 RNA 合成，在病毒复制中起重要作用，对于病毒活力是必需的。3D<sup>pol</sup> 的抑制剂能够抑制病毒基因组和病毒复制，成为了抗病毒药物开发的重要靶点。

本课题中，我们利用分子克隆技术、蛋白表达和纯化、结晶的方法得到了

蛋白晶体，但是晶体衍射率比较低，还需要进一步优化得到高分辨率的晶体以用于后续小分子片断的筛选实验。

关键词：EV71 ； 3C 蛋白酶； 抑制剂； CVB3； 3D 聚合酶

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## Abstract

The structure-based design of inhibitors in this thesis is comprised of two parts targeting 1) 3C protease from enterovirus 71, and 2) 3D polymerase from Coxsachivirus B3.

1) Hand-foot-mouth disease (HFMD) is a global infectious diseases caused by enteroviruses. In recent years, its morbidity in China has increased significantly. Among the causative agents of HFMD, enterovirus 71 (EV71) is the main one. This virus can lead to serious neurological complications, and even lead to death. It is of great importance to find treatment for HFMD.

3C protease plays a key role in the maturation of EV71 proteins. 3C protease can also act on a variety of transcription factors and cytokines in host cells, inhibit the expression of host protein and interfere with the immune mechanisms of the host. In addition, 3C protease is with RNA binding activity and play a role in virus replication. 3C protease is a significant target for the design and development of therapeutics.

In this project, we screened a drug library with 3C protease as the target. The complex structures of 3C protease and small molecule fragments were analyzed by X-ray crystallography and a compound bound to the RNA binding region of 3C protease was identified, which laid the foundation for the fragment-based drug design.

2) Viral myocarditis is caused by viruses that can damage myocardium. Currently, domestic VMC mortality rates were on the rise. Among the enterovirus, Coxsackievirus B3 is an important pathogen in viral myocarditis. CVB3 can also induce the injury or death of human pancreatic islet  $\beta$ -cells, and it is thought to be associated with type I adolescent diabetes or insulin-independent diabetes mellitus.

3D<sup>pol</sup> is an RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) and vital to the life cycle of the RNA virus. 3D<sup>pol</sup> is responsible for the initial negative and subsequent positive strand RNA synthesis, and is important to the viral replication and viability. The 3D<sup>pol</sup> inhibitors can inhibit the viral genome and viral replication and is a significant target

for the development of antiviral drugs.

To establish a system for structure-based drug design and development, we used technologies of molecular cloning, protein expression and purification to obtain the proteins and the crystals of 3D<sup>pol</sup> were made. However, only a small portion of the crystals diffracted X-ray to high resolution. Further optimization was needed to crystallize 3D<sup>pol</sup> in a consistent fashion for the drug design and development.

Key words: EV71; 3C protease; inhibitor; CVB3; 3D polymerase

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 目录

|                                    |           |
|------------------------------------|-----------|
| 摘要.....                            | I         |
| Abstract.....                      | III       |
| <b>1 前言.....</b>                   | <b>1</b>  |
| <b>1.1 手足口病概述.....</b>             | <b>1</b>  |
| 1.1.1 手足口病的简介.....                 | 1         |
| 1.1.2 手足口病的传播与流行.....              | 2         |
| 1.1.3 手足口病的病原学特征.....              | 2         |
| 1.1.4 手足口病的预防与治疗.....              | 3         |
| <b>1.2 肠道病毒 71 型 (EV71) .....</b>  | <b>3</b>  |
| 1.2.1 肠道病毒 71 型简介.....             | 3         |
| 1.2.2 EV71 基因组结构.....              | 4         |
| 1.2.3 EV71 病毒颗粒结构.....             | 5         |
| 1.2.4 EV71 的生活史.....               | 6         |
| <b>1.3 EV71 3C 蛋白酶.....</b>        | <b>7</b>  |
| 1.3.1 3C 蛋白酶简介.....                | 7         |
| 1.3.2 3C 蛋白酶的作用.....               | 11        |
| 1.3.3 3C 蛋白酶抑制剂的研究进展.....          | 11        |
| <b>1.4 柯萨奇病毒 B3 型 (CVB3) .....</b> | <b>13</b> |
| 1.4.1 柯萨奇病毒 B3 型简介.....            | 13        |
| 1.4.2 CVB3 基因组和病毒颗粒结构.....         | 15        |
| 1.4.3 CVB3 致病机理和研究进展.....          | 16        |
| <b>1.5. CVB3 3D 聚合酶.....</b>       | <b>17</b> |
| 1.5.1 3D 聚合酶简介.....                | 17        |
| 1.5.2 3D 聚合酶起始与延伸.....             | 19        |
| 1.5.2 CVB3 3D 聚合酶抑制剂的研究进展.....     | 21        |
| <b>1.6 结构生物学概述.....</b>            | <b>21</b> |



|  |           |
|--|-----------|
| <b>1.7 蛋白质的结晶</b> .....                    | <b>22</b> |
| 1.7.1 蛋白质的结晶方法.....                        | 22        |
| 1.7.2 影响蛋白晶体的因素.....                       | 23        |
| <b>1.8 基于片段的药物发现技术</b> .....               | <b>23</b> |
| <b>1.9 课题的研究意义</b> .....                   | <b>24</b> |
| 1.9.1 EV71 3C 蛋白酶药物研究的意义.....              | 24        |
| 1.9.2 CVB3 3D <sup>pol</sup> 药物研究的意义.....  | 25        |
| <b>2 材料与方法</b> .....                       | <b>26</b> |
| <b>2.1 实验材料</b> .....                      | <b>26</b> |
| 2.1.1 质粒与菌株.....                           | 26        |
| 2.1.2 实验试剂.....                            | 26        |
| 2.1.3 主要仪器.....                            | 27        |
| <b>2.2 常用试剂的配制</b> .....                   | <b>28</b> |
| 2.2.1 培养基及细菌培养相关溶液的配制.....                 | 28        |
| 2.2.2 分子克隆相关试剂的配制.....                     | 30        |
| 2.2.3 琼脂糖凝胶电泳相关试剂的配制.....                  | 30        |
| 2.2.4 SDS-PAGE 相关溶液的配制.....                | 30        |
| 2.2.5 重组蛋白纯化相关试剂.....                      | 32        |
| 2.2.5.1 EV71 3C 蛋白酶纯化相关试剂.....             | 32        |
| 2.2.5.2 CVB3 3D <sup>pol</sup> 纯化相关试剂..... | 33        |
| <b>2.3 实验方法</b> .....                      | <b>33</b> |
| 2.3.1 重组蛋白表达质粒的构建.....                     | 33        |
| 2.3.1.1 大肠杆菌超级感受态的制备.....                  | 33        |
| 2.3.1.2 转化.....                            | 34        |
| 2.3.1.3 目的基因的获取.....                       | 34        |
| 2.3.1.4 引物设计.....                          | 34        |
| 2.3.1.5 目的片段的扩增及回收.....                    | 35        |
| 2.3.1.6 原核表达载体的制备.....                     | 36        |
| 2.3.1.7 双酶切载体.....                         | 36        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.3.1.8 目的片段与酶切载体连接.....                              | 36        |
| 2.3.2 重组蛋白的表达.....                                    | 37        |
| 2.3.2.1 重组蛋白表达条件的摸索.....                              | 37        |
| 2.3.2.2 目的蛋白的 SDS-PAGE 电泳检测.....                      | 38        |
| 2.3.2.3 重组蛋白的大量表达.....                                | 38        |
| 2.3.3 EV71 3C 蛋白酶的纯化.....                             | 38        |
| 2.3.3.1 Ni-NTA 亲和柱层析.....                             | 38        |
| 2.3.3.2 脱盐柱置换缓冲液.....                                 | 39        |
| 2.3.3.3 离子交换柱层析.....                                  | 40        |
| 2.3.4 CVB3 3D 聚合酶的纯化.....                             | 40        |
| 2.3.4.1 Ni-NTA 亲和柱层析.....                             | 40        |
| 2.3.4.2 凝胶过滤柱层析.....                                  | 40        |
| 2.3.5 重组蛋白的结晶.....                                    | 41        |
| 2.3.5.1 结晶条件的初筛.....                                  | 41        |
| 2.3.5.2 结晶条件的优化.....                                  | 41        |
| 2.3.5.3 获得复合物晶体.....                                  | 41        |
| 2.3.5.4 衍射数据的收集和处理.....                               | 42        |
| 2.3.5.5 结构解析.....                                     | 42        |
| <b>3 结果分析与讨论.....</b>                                 | <b>43</b> |
| <b>3.1 EV71 3C 蛋白酶的 药物筛选.....</b>                     | <b>43</b> |
| 3.1.1 EV71 3C 蛋白酶的 表达与纯化.....                         | 43        |
| 3.1.2 3C 蛋白酶的 结晶.....                                 | 45        |
| 3.1.3 3C 蛋白酶与 小分子晶体复合物的 获得.....                       | 47        |
| 3.1.4 衍射数据的 收集和结构解析.....                              | 48        |
| 3.1.5 3C 蛋白酶晶体与 小分子复合物的 结构.....                       | 50        |
| 3.1.6 讨论与 总结.....                                     | 52        |
| <b>3.2 柯萨奇病毒 B3 型 3D<sup>pol</sup> 的 结构生物学研究.....</b> | <b>53</b> |
| 3.2.1 CVB3 3D <sup>pol</sup> 的 表达与纯化.....             | 53        |
| 3.2.2 CVB3 3D <sup>pol</sup> 的 结晶.....                | 59        |

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| 3.2.3 衍射数据的收集和结构解析..... | 61        |
| 3.2.4 讨论与总结.....        | 63        |
| <b>参考文献.....</b>        | <b>65</b> |
| <b>致谢.....</b>          | <b>65</b> |

厦门大学博硕士论文摘要库

## Contents

|   |            |
|---|------------|
| <b>Abstract in Chinese.....</b>                                   | <b>I</b>   |
| <b>Abstract in English.....</b>                                   | <b>III</b> |
| <b>1 Introduction.....</b>  | <b>1</b>   |
| <b>1.1 Overview of hand, foot and mouth disease (HFMD).....</b>   | <b>1</b>   |
| 1.1.1 Introduction of HFMD.....                                   | 1          |
| 1.1.2 Spread and epidemic of HFMD.....                            | 1          |
| 1.1.3 Etiological features of HFMD.....                           | 2          |
| 1.1.4 Prevention and treatment of HFMD.....                       | 2          |
| <b>1.2 Enterovirus 71 (EV71) .....</b>                            | <b>3</b>   |
| 1.2.1 Intruduction of Enterovirus 71.....                         | 3          |
| 1.2.2 Genomic structure of EV71.....                              | 3          |
| 1.2.3 Particle structure of EV71 .....                            | 4          |
| 1.2.4 Life cycle of EV71.....                                     | 5          |
| <b>1.3 EV71 3C protease .....</b>                                 | <b>7</b>   |
| 1.3.1 Introduction of 3C protease.....                            | 7          |
| 1.3.2 Function of 3C protease.....                                | 10         |
| 1.3.3 Research progress of 3C protease inhibitor.....             | 11         |
| <b>1.4 Coxsackie virus B3 (CVB3) .....</b>                        | <b>13</b>  |
| 1.4.1 Introduction of Coxsackie virus B3.....                     | 13         |
| 1.4.2 Genomic and particle structure of CVB3.....                 | 14         |
| 1.4.3 Pathogenesis and research progress of CVB3 inhibitor.....   | 14         |
| <b>1.5 CVB3 3D<sup>pol</sup>.....</b>                             | <b>15</b>  |
| 1.5.1 Introduction of CVB3 3D <sup>pol</sup> .....                | 15         |
| 1.5.2 Initiation and extention of CVB3 3D <sup>pol</sup> .....    | 17         |
| 1.5.3 Research progress of CVB3 3D <sup>pol</sup> inhibitor ..... | 19         |
| <b>1.6 Introduction of structral biology.....</b>                 | <b>19</b>  |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1.7 Crystallization of protein.....</b>   | <b>20</b> |
| 1.7.1 Method of protein Crystallization .....  | 20        |
| 1.7.2 Influence factors of protein crystal.....                                      | 21        |
| <b>1.8 Fragment based drug discovery.....</b>  | <b>23</b> |
| <b>1.9 Significance of this research.....</b>  | <b>24</b> |
| 1.9.1 Significance of research on 3Cprotease inhibitor.....                          | 24        |
| 1.9.2 Significance of research on CVB3 3D <sup>po</sup> inhibitor <sup>1</sup> ..... | 25        |
| <b>2 Materials and methods.....</b>  | <b>26</b> |
| <b>2.1 Materials.....</b>  | <b>26</b> |
| 2.1.1 Plasmid and bacteria strains.....  | 26        |
| 2.1.2 Experiment reagents.....   | 26        |
| 2.1.3 Experiment instruments.....  | 27        |
| <b>2.2 Preparation of common reagents.....</b>                                       | <b>28</b> |
| 2.2.1 Preparation of culture medium and solution.....                                | 28        |
| 2.2.2 Reagents preparation for molecular cloning.....                                | 30        |
| 2.2.3 Preparation of reagents for AGE.....   | 30        |
| 2.2.4 Reagents preparation for SDS-PAGE.....   | 30        |
| 2.2.5 Reagents for recombinant protein purification.....                             | 32        |
| 2.2.5.1 Reagents for EV71 3C protease purification.....                              | 32        |
| 2.2.5.2 Reagents for CVB3 3D <sup>pol</sup> purification.....                        | 33        |
| <b>2.3 Experimental methods.....</b>   | <b>33</b> |
| 2.3.1 Construction of recombinant plasmids.....                                      | 33        |
| 2.3.1.1 Preparation of competent cell.....   | 33        |
| 2.3.1.2 Transformation.....  | 34        |
| 2.3.1.3 Obtain of target gene.....   | 34        |
| 2.3.1.4 Primer design.....   | 34        |
| 2.3.1.5 Amplification and recycling of target fragment.....                          | 35        |
| 2.3.1.6 Preparation of prokaryotic expression vector.....                            | 36        |
| 2.3.1.7 Restriction endonuclease digestion.....                                      | 36        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.3.1.8 Ligation of target gene and vector.....                             | 36        |
| 2.3.2 Expression of recombinant protein.....                                | 37        |
| 2.3.2.1 Test of recombinant protein purification.....                       | 37        |
| 2.3.2.2 SDS-PAGE electrophoresis detection.....                             | 38        |
| 2.3.2.3 Expression of recombinant protein in large scale .....              | 38        |
| 2.3.3 Purification of EV71 3C protease.....                                 | 38        |
| 2.3.3.1 Ni-NTA affinity chromatography .....                                | 38        |
| 2.3.3.2 Buffer replacement by desalting.....                                | 39        |
| 2.3.3.3 ion exchange chromatography.....                                    | 40        |
| 2.3.4 Purification of CVB3 3D <sup>pol</sup> .....                          | 40        |
| 2.3.4.1 Ni-NTA affinity chromatography .....                                | 40        |
| 2.3.4.2 Gel filtration chromatography.....                                  | 40        |
| 2.3.5 Crystallization of recombinant protein.....                           | 41        |
| 2.3.5.1 Crystallization screening.....                                      | 41        |
| 2.3.5.2 Optimization of crystallization condition.....                      | 41        |
| 2.3.5.3 Obtain of crystal complex.....                                      | 41        |
| 2.3.5.4 Diffraction data collection and data processing.....                | 42        |
| 2.3.5.5 Structure determination.....  | 42        |
| <b>3 Results analysis and discussion.....</b>                               | <b>43</b> |
| 3.1 Drug screening of EV71 3C <sup>pro</sup> .....                          | 43        |
| 3.1.1 Expression and purification of EV71 3C.....                           | 43        |
| 3.1.2 Crystallization of 3C <sup>pro</sup> .....                            | 45        |
| 3.1.3 Obtain of 3C <sup>pro</sup> crystal and micromolecule complex.....    | 47        |
| 3.1.4 Diffraction data collection and data processing.....                  | 48        |
| 3.1.5 Structure of 3C <sup>pro</sup> crystal and micromolecule complex..... | 50        |
| 3.1.6 Discussion and summary.....   | 52        |
| 3.2 Structure biology of Coxsackie virus B3 3D <sup>pol</sup> .....         | 53        |
| 3.2.1 Expression and purification of CVB3 3D <sup>pol</sup> .....           | 53        |
| 3.2.2 Crystallization of CVB3 3D <sup>pol</sup> .....                       | 59        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.3 Diffraction data collection and data processing..... | 61        |
| 3.2.4 Discussion and summary.....                          | 63        |
| <b>4 Reference.....</b>                                    | <b>65</b> |
| <b>5 Acknowledgement.....</b>                              | <b>75</b> |

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# 1 前言

## 1.1 手足口病概述

### 1.1.1 手足口病的简介

手足口病( Hand, foot and mouth disease, HFMD ), 是一种多发生于婴幼儿中的传染病, 该病是由肠道病毒感染导致的。1957 年该病的流行在新西兰首次被报道, 1958 年分离出了柯萨奇病毒<sup>[1]</sup>, Alsop 等在 1959 年根据疾病病变分布将其命名为“手足口病”。手足口病的爆发和流行已涉及世界多个国家和地区, 对全球的公共卫生造成了严重的威胁。近几年来, 手足口病在中国频繁发生, 并具有季节性的特点。2008 年, 手足口病被卫生部纳入丙类传染病管理范围内。

在春季, 夏季和秋季温暖的温度下, 手足口病趋于发生, 呈季节性强劲, 湿度升高时发病率显着升高, 因为致病病毒的感染在炎热和潮湿的条件下急剧增加。该病多发生于 5 岁以下的儿童, 因为婴幼儿的免疫力较弱。手足口病是一种发热性疾病, 临床表现为前驱性发烧之后是咽炎, 嘴巴和手脚皮疹, 并且与口腔溃疡有关系(图 1-1)。病毒的感染通常是自限制的, 但是传染性很强。大多数患者在一周内恢复, 但有一些严重病例会出现一系列神经系统并发症包括惊厥, 共济失调, 脑脊髓炎, 脊髓灰质炎样麻痹, 更严重者甚至会导致死亡<sup>[2]</sup>, 从脑炎中恢复的儿童可能会留下显著的神经后遗症。



图 1-1 手足口病的临床症状

Figure 1-1 The clinical symptom of HFMD

图为手足口病典型临床症状: 左图为口部的疱疹, 右图为手部的疱疹。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库