

甲型 H1N1 流感病毒非结构蛋白 NS1 与人 CPSF30 结合拮抗剂筛选模型的建立及药物筛选

孔建强, 沈君豪, 黄 勇, 阮仁余, 项 斌, 郑晓东, 程克棣, 王 伟*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 卫生部天然药物生物合成重点实验室、
中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100050)

摘要: 利用酵母双杂交技术研究甲型 H1N1 流感病毒非结构蛋白 NS1 和人切割与多聚腺苷酸化特异因子 30 kDa 亚基 (CPSF30) 的相互作用, 构建了一个酵母模型用于筛选 NS1 和 CPSF30 相互作用的拮抗剂, 从而为筛选抗甲型 H1N1 流感病毒药物奠定基础。采用连续重叠 PCR 技术克隆得到 H1N1 流感病毒 NS1 基因。提取人 HeLa 细胞 RNA, 通过 RT-PCR 克隆得到人 CPSF30 基因。将 NS1 基因克隆到表达载体 pGBKT7 中获得诱饵载体 pGBKNS1, 将 CPSF30 基因克隆到载体 pGADT7 中获得捕获载体 pGADCPSF; 将 pGBKNS1 和 pGADCPSF 共转入酿酒酵母 AH109, 获得重组酿酒酵母 AH109[pGADCPSF+pGBKNS1]。利用该模型筛选了 30 余种中成药, 发现双黄连口服液等 4 种中成药能抑制 NS1 和 CPSF30 之间的相互作用。

关键词: H1N1 流感病毒; 非结构蛋白 NS1; CPSF30; 酵母模型; 中药筛选

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 03-0388-07

Development of a yeast two-hybrid screen for selection of A/H1N1 influenza NS1 non-structural protein and human CPSF30 protein interaction inhibitors

KONG Jian-qiang, SHEN Jun-hao, HUANG Yong, RUAN Ren-yu, XIANG Bin, ZHENG Xiao-dong, CHENG Ke-di, WANG Wei*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Key Laboratory of Biosynthesis of Natural Products, Ministry of Health of PRC & Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Health of PRC, Beijing 100050, China)

Abstract: Influenza A/H1N1 virus-encoded nonstructural, or NS1, protein inhibits the 3'-end processing of cellular pre-mRNAs by binding the cellular protein: the 30-kDa subunit of CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor, CPSF30). CPSF30 binding site of the NS1 protein is a potential target for the development of drugs against influenza A/H1N1 virus. A yeast two-hybrid screening system was constructed and used for screening Chinese medicines that inhibit the interaction of the A/H1N1 flu NS1 protein and human CPSF30 protein. The NS1 gene of A/H1N1 virus was amplified by consecutive polymerase chain reaction (PCR), and the human CPSF30 gene of HeLa cell cloned by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Then the two gene fragments confirmed by sequencing were subcloned into the yeast expression vectors pGBKT7 and pGADT7, respectively. The two constructs, bait vector pGBKNS1 and prey vector pGADCPSF, were co-transformed into yeast AH109. The eight individual yeast colonies were picked and subjected to verification by PCR/gel electrophoresis. The inhibition of the NS1-CPSF30 interaction was allowed the

收稿日期: 2010-01-05.

基金项目: 科技部甲型 H1N1 流感联防联控应急科研项目; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2010ZD04).

*通讯作者 Tel: 86-10-630165196, Fax: 86-10-63017757, E-mail: wwang@imm.ac.cn

identification of selective inhibitors. The four of more than thirty identified Chinese medicines, including 'Shuanghuanglian oral liquid', showed the strong inhibition of the NS1-CPSF30 interaction.

Key words: novel A/H1N1 influenza; NS1 non-structural protein; CPSF30; yeast two-hybrid system; screening of Chinese medicines

由墨西哥发端的甲型 H1N1 流感自 2009 年 3 月底以来已造成多人死亡, 并蔓延至中国。由于传播迅速, 世界卫生组织于 2009 年 6 月 11 日正式宣布把甲型 H1N1 流感警戒级别升至 6 级, 这意味着世界卫生组织认为疫情已经发展为全球性“流感大流行”, 严重威胁到人类的安全。因此, 研制对抗甲型 H1N1 流感的药物具有很重要的意义, 是保护人类安全所必需的。

NS1 蛋白是甲型流感病毒唯一的非结构蛋白, 由病毒基因组片段 8 编码; 单体由 202~237 个氨基酸残基组成, 此次流行的甲型 H1N1 流感病毒 NS1 蛋白由 219 个氨基酸残基组成, 是猪、禽和人 H1N1 流感病毒的杂交体。目前研究认为 NS1 蛋白至少含有 3 个功能区, 即 RNA 结合区 (RNA binding domain, RBD), eIF4GI (eukaryotic translation initiation factor 4GI) 结合区和效应区 (effector domain)^[1, 2]。NS1 蛋白是个多功能的非结构蛋白, 在病毒感染早期发挥作用。其主要功能表现在: 抑制宿主细胞抗病毒蛋白的形成^[3-5]; 影响细胞凋亡^[6-8]以及拮抗干扰素的产生^[9-11]等。NS1 蛋白能和切割与多聚腺苷酸化特异性因子 (cleavage and polyadenylation specificity factor, CPSF) 的 30 kDa 亚单位相互作用, 影响宿主蛋白 pre-mRNA 3'端的剪切, 从而抑制宿主蛋白的合成^[12]。Noah 等^[13]证明流感病毒是通过 NS1-CPSF 之间的相互作用来抑制早期细胞内 IFN- α/β 非依赖性抗病毒活性的 pre-mRNA 的转录后加工过程来发挥作用的。Twu 等^[14]采用一段包含 61 个氨基酸的多肽特异性地与 NS1 蛋白结合, 发现甲型禽流感病毒的复制被抑制, 而对宿主 pre-mRNA 的 3'加工没有影响。因此, NS1 上的 CPSF30 结合位点被认为是一个可作为药物筛选的靶点。

酵母双杂交系统建立于 1989 年^[15], 是在研究真核基因转录调控中建立起来的。酵母双杂交系统包括 3 个部分: 与 BD (DNA binding domain, DNA 结合结构域) 融合蛋白表达载体, 被表达的蛋白称为诱饵蛋白质 (bait protein); 与 AD (transcriptional activation domain, 转录激活结构域) 融合蛋白表达载体, 表达的蛋白称为捕获蛋白 (prey protein); 带有 1 个或多个报告基因的酵母菌株用以检测两个表达蛋白相互

作用与否。酵母双杂交系统在研究蛋白质相互作用方面具有很大的优势。本研究根据 NS1 和 CPSF30 结合的特点, 采用酵母双杂交技术构建药物筛选模型, 筛选 NS1 和 CPSF30 之间相互作用的拮抗剂, 从而为进一步筛选获得具有抗甲型 H1N1 流感的化合物奠定基础。

材料与方法

菌种和试剂 宿主菌 *E. coli* TG1 为本实验室保存, 克隆质粒 pMD18-T 和 T4 DNA 连接酶均购于大连宝生物工程公司; 克隆载体 EZ-T 购自北京康润诚业生物科技有限公司; KOD-Plus Taq DNA 聚合酶购自 Toyobo 公司; DNA 胶回收试剂盒购自 BBI 公司; ThermoScript™ RT-PCR System 试剂盒购自 Invitrogen 公司; Lyticase 购自天根生物公司; 显色底物 X- α -Gal 购自 Clontech 公司; PNP- α -Gal 购自 Sigma 公司。其他生化试剂均为市售分析纯试剂。酿酒酵母 AH109、酵母表达载体 pGBKT7 和 pGADT7 购自 Clontech 公司。

大肠杆菌在不加抗生素的 LB 培养基 (10 g·L⁻¹ bacto-tryptone, 5 g·L⁻¹ bacto-yeast extract, 10 g·L⁻¹ NaCl) 中进行培养, 转化菌株的选择在加有 100 μ g·mL⁻¹ 氨苄青霉素或 50 μ g·mL⁻¹ 卡那霉素的 LB 中进行。

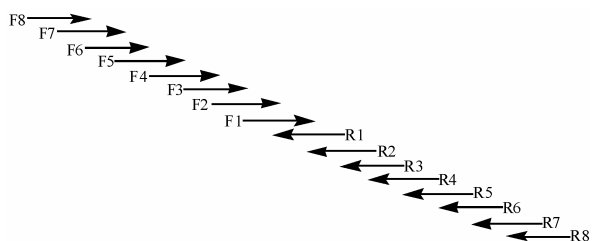
YPD 培养基 (10 g·L⁻¹ yeast extract; 10 g·L⁻¹ bacto-peptone; 20 g·L⁻¹ glucose; 固体培养基添加 2% 的琼脂粉) 用于酵母的培养; SC-drop out 培养基 (7 g·L⁻¹ yeast nitrogen base; 2 g·L⁻¹ drop-out 混合物, 20 g·L⁻¹ glucose, 固体培养基添加 2% 的琼脂粉) 用于酵母的胁迫培养。

NS1 基因的合成 根据已经发表的 H1N1 病毒 NS1 基因序列 [A/Texas/05/2009 (H1N1) GenBank 注册号: FJ966966] 设计引物 (表 1), 通过连续重叠 PCR 获得 NS1 基因, 合成示意图见图 1, 合成过程涉及的 PCR 反应、连接、转化等常规分子生物学技术参考文献[16]进行。

CPSF30 基因的合成 采用 Trizol 提取人 HeLa 细胞 RNA, 利用 Invitrogen 公司的 ThermoScript RT-PCR 系统, 以 Oligo d (T) 为反转录引物, 将 HeLa

Table 1 The sequences of primers used in synthesis of *NSI* gene of the A/Texas/05/2009 (H1N1)

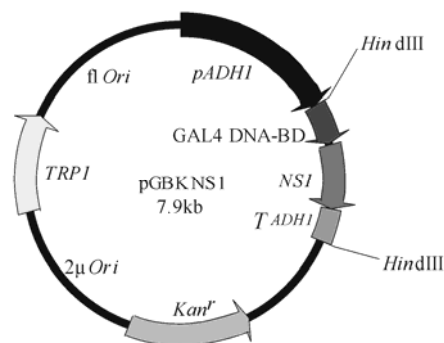
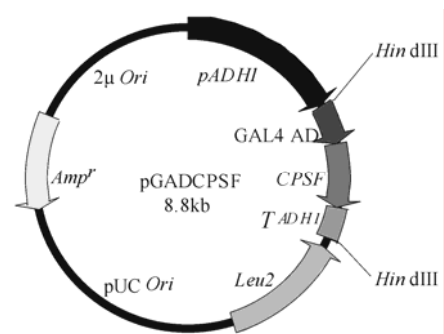
Primer	Sequence (5'-3')
FHN1-1	cgaggaaatgtcacgagactgggtcatgctcatgcttaggcaaaagataataggccctc
RHN1-1	actatgttctttccatgatcgccctggccaatcgacgcaaaagaggcctattatctt
FHN1-2	attgcatctgtactacttcgcgctaccttctgacatgacctcgaggaaatgtcacg
RHN1-2	aaggctcttaatcggttaaagattacactgaagttcgcttctgactatgttctttc
FHN1-3	gaatggatcttgaagaggaaatccagcgagacacttagaatgacaattgcatctgtacc
RHN1-3	ctccaactattgctccctcctcagtgaaagcccttagtagtatcaaggtctctaactcg
FHN1-4	gcctcgatcgaacagccactctgtgtgggaacaaatcggtgaatggatcttgaaa
RHN1-4	atcctcataagtatgtcctggaagagaaggtaaggtgaaatttccaactattgctc
FHN1-5	cgccgagatcaaaagtcctaaaaggagggcaacacccttgccctcgatcgaagaa
RHN1-5	ttcattcaagtctcctcgatgaggacccaactgcattttgacatcctcataagtatg
FHN1-6	ttgcagacaatggatgggtgatgcccattcctgacggtccgccgagatcaaaag
RHN1-6	caagcgaatctctgtataatttcagagactgaaccgtgttaccattccattcaagtc
FHN1-7	gcttcaggtagactgttctcttgcatatccgcaagcgattgacagacaatggattg
RHN1-7	tgctctggagtagtggaaggtctccattctcatcacagtttccaagcgaatctctg
FHN1-8	aggatccatggactccaacacatgtcaagcttccaggtagactg
RHN1-8	actcgatcatttctgctctggaggtagtg
FCPSFNdeI	acatatgatgcaggaaatcatcgccagcggtgg
RCPSF2	actcgagtcactgtccactgagaaggccaag

**Figure 1** The *NSI* gene fragment amplified by consecutive polymerase chain reaction (PCR). The markers from F1 to F8 indicate the primers from FHN1-1 to FHN1-8, and the markers from R1 to R8 corresponding to primers from RHN1 to RHN8

细胞 RNA 反转录成 cDNA。以 FCPSFNdeI 和 RCPSF2 (表 1) 为引物、HeLa 细胞的 cDNA 为模板, 采用 KOD Plus DNA 聚合酶进行 PCR 反应, 扩增得到 *CPSF30* 基因。详细的反转录过程参考说明书, 合成过程涉及的 PCR 反应、连接、转化等常规分子生物学技术参考文献[16]进行。

酵母表达载体的构建 用 *Nco* I/*Eco*R I 酶切 pEZNS1, 回收长约 660 bp 的条带, 和同样用 *Nco* I/*Eco*R I 酶切的 pGBKT7 连接, 得到含 *NSI* 基因的酿酒酵母表达载体 pGBKNS1 (图 2); 用 *Nde* I/*Xho* I 酶切 pMDCPSF, 回收长为 810 bp 的条带, 和同样用 *Nde* I/*Xho* I 酶切的 pGADT7 连接, 得到含 *CPSF30* 基因的酿酒酵母表达载体 pGADCPSF (图 3)。载体构建过程涉及的酶切、连接、回收、纯化和转化等常规分子生物学技术参考文献[16]进行。

酵母转化及阳性克隆鉴定 根据 Gietz 等^[17]介绍的方法, 将 pGADCPSF 和 pGBKNS1 共转入酿酒酵

**Figure 2** The map of plasmid pGBKNS1. The *NSI* gene is fused to Gal4 DNA-binding domain (BD) of pGBKT7**Figure 3** The map of plasmid pGADCPSF. The *CPSF30* gene is fused to Gal4 DNA activation domain (AD) of pGADT7

母 AH109 中, 转化产物铺在 SC-Ade-Leu-Trp-His 培养基上, 28 °C 培养 3~5 d 直至长出转化子, 挑取转化子接种到液体 SC-Ade-Leu-Trp-His 培养基中, 28 °C 培养 2 d 提取酵母质粒进行 PCR 鉴定。*NSI* 基因的检测采用引物 FHN1-2 和 RHN1-2, 而 *CPSF30* 基因的检测采用引物 FCPSFNdeI 和 RCPSF2。酵母转化过程

中, 参考文献[18]进行酵母质粒的提取和菌落 PCR 鉴定。

中药筛选 选取 7 种针剂、10 种口服液以及 15 种颗粒剂配制成不同浓度的溶液进行药物初步筛选。首先将中药以及显色底物 X- α -Gal 加入 SC-Ade-Leu-Trp-His 固体培养基中, 配制筛选培养基。然后将鉴定正确的酵母模型菌株接种到筛选培养基上, 28 °C 培养 2 d, 根据菌落生长的大小以及显色反应初步筛选出对 NS1 和 CPSF30 有拮抗作用的中药进入下一轮复筛。

中药复筛主要按如下方法进行: 酵母模型菌株接种到 2~5 mL 的 SC-Ade-Leu-Trp-His 培养基中, 250 r·min⁻¹、30 °C 培养 16~18 h。然后, 在 96 孔板上加入 200 μ L 的菌液和 200 μ L 的不同浓度药品溶液, 30 °C 培养 24 h。通过酶标仪, 测定这些菌液的 A_{600} 。然后将菌液于 2 900 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取出上清液备用。在 96 孔板上加入菌液上清液 16 μ L 和试验缓冲液 (0.5 mol·L⁻¹ NaAc 32 μ L; 100 mmol·L⁻¹ PNP- α -Gal 16 μ L) 48 μ L, 30 °C 培养 60 min。加入 10 $\times$ 终止反应液 (1 mol·L⁻¹ Na₂CO₃) 136 μ L, 记录 A_{410} 值。通过公式计算 α -半乳糖苷酶活性: α -半乳糖苷酶活性 (milliunits) = $A_{410} \times V_f \times 1\,000 / (\epsilon \times b \times t \times V_i \times A_{600})$ 。其中, t 指菌液上清液与实验缓冲液在 30 °C 的孵育时间 (以分钟为单位); V_f 是指检测 A_{410} 时反应孔内的总体积 (200 μ L); V_i 是指所加入的菌液上清液的体积 (16 μ L); A_{410} 和 A_{600} 为实验所测; $\epsilon \times b$ 为 p -nitrophenol 在 410 nm 处的摩尔吸光系数 (10.5 mL·mol⁻¹); 根据 α -半乳糖苷酶的酶量变化来确定酵母细胞受抑制的程度, 从而确定对 NS1 和 CPSF30 结合有抑制作用的中药。

结果

1 NS1 基因的合成

采用连续重叠 PCR 技术合成 NS1 基因。以 FHN1-1/RHN1-1 为引物, 两条引物互为模板, 用 KOD Plus DNA 聚合酶进行扩增, 得到一条长约 100 bp 的条带。然后以 FHN1-2/RHN1-2 为引物, 以 FHN1-1/RHN1-1 的 PCR 产物稀释 100 倍为模板, 退火温度不变, 延伸时间增加 5 s, 扩增出 200 bp 左右的单一的条带。一直按照这种方式, 每一轮扩增延伸时间均增加 5 s, 连续扩增 4 轮, 以 FHN1-7/RHN1-7 为引物, FHN1-6/RHN1-6 的 PCR 产物稀释 100 倍为模板, 得到 450 bp 左右单一条带。以 FHN1-8/RHN1-8 为引物, 以 FHN1-7/RHN1-7 的 PCR 产物稀释 100 倍

为模板, KOD Plus DNA 聚合酶进行扩增, 得到一条长为 660 bp 左右的单一条带 (图 4)。将该条带纯化回收, 通过 T-A 克隆至 EZ-T 载体上, 测序验证正确后, 将该载体命名为 pEZNS1。

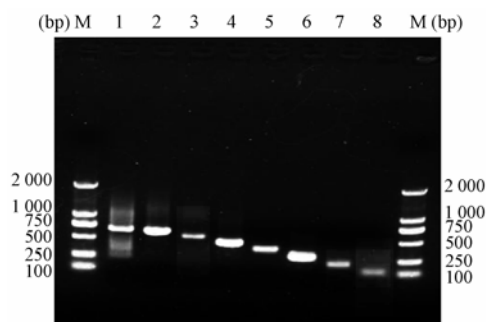


Figure 4 The results of NS1 gene fragment amplified by consecutive polymerase chain reaction (PCR). Lane 1 to 8: The DNA fragments amplified by consecutive PCR with the primer pairs FHN1-8/RHN1-8, FHN1-7/RHN1-7, FHN1-6/RHN1-6, FHN1-5/RHN1-5, FHN1-4/RHN1-4, FHN1-3/RHN1-3, FHN1-2/RHN1-2 and FHN1-1/RHN1-1, respectively; M: DL2000 DNA marker

2 CPSF30 基因的克隆

通过 RT-PCR 反应得到长约 800 bp 的条带 (图 5)。回收该条带, 将其 T-A 克隆至 pMD18-T 载体上。测序及 Blast N 比对表明, 该序列就是 CPSF30 基因, 与 GenBank 注册号为 NM_006693 的序列 100% 相同。将正确的重组载体命名为 pMDCPSF。

3 酿酒酵母表达载体的构建

采用 Nco I/EcoR I 对 pGBKNS1 进行酶切鉴定 (图 6), 其 660 bp 左右的条带与 NS1 基因大小吻合, 表明 pGBKNS1 构建正确。使用 Nde I/Xho I 对 pGADCPSF 进行酶切鉴定 (图 7), 其 800 bp 左右的

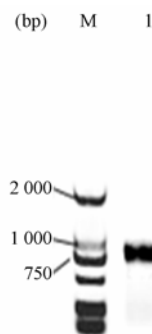


Figure 5 The CPSF30 gene fragment amplified by RT-PCR. Lane 1: The DNA fragment of CPSF30 gene; M: DL2000 DNA marker

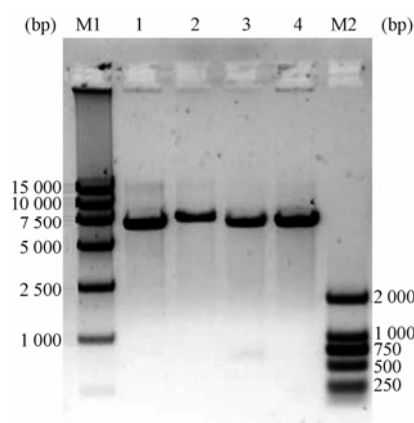


Figure 6 The analysis of plasmid pGBKNS1 digested with restriction enzyme. Lane 1 and 2: The plasmids pGBKT7 and pGBKNS1 digested with *EcoR* I, respectively; lane 3 and 4: The plasmids pGBKNS1 and pGBKT7 digested with *EcoR* I and *Nco* I, respectively; M1 and M2: The DNA markers DL15000 and DL2000, respectively

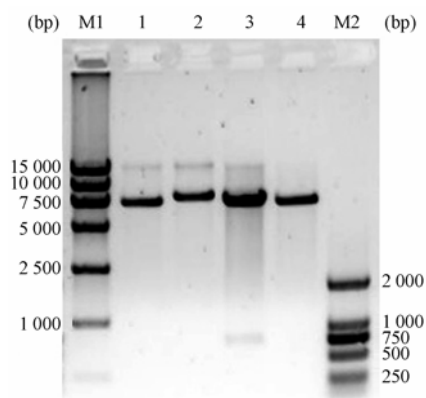


Figure 7 The analysis of plasmid pGADCPHF digested with restriction enzyme. Lane 1 and 2: The plasmids pGADT7 and pGADCPHF digested with *Xho* I, respectively; lane 3 and 4: The plasmids pGADCPHF and pGADT7 digested with *Nde* I and *Xho* I, respectively; M1 and M2: DNA markers DL15000 and DL2000, respectively

条带与 *CPSF30* 基因大小吻合, 表明 pGADCPHF 构建正确。

4 酵母模型的构建

对共转入 pGADCPHF 和 pGBKNS1 质粒的重组

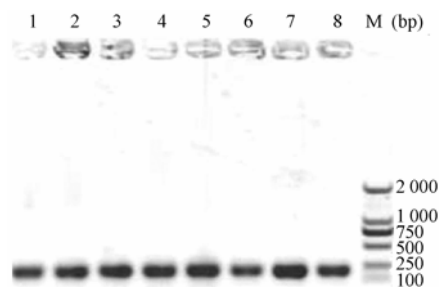


Figure 8 The PCR results of *NSI* gene of positive colonies. Lane 1 to 8: The eight positive colonies AH109[pGADCPHF+pGBKNS1]; M: DNA marker DL2000

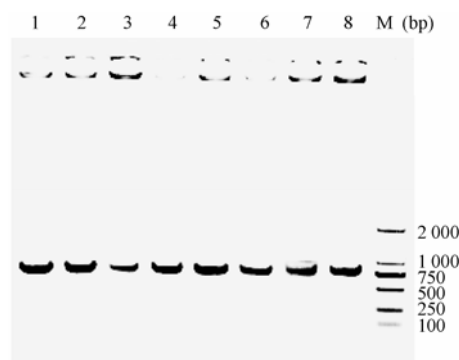


Figure 9 The PCR results of *CPSF30* gene of positive colonies. Lane 1 to 8: The eight positive colonies AH109[pGADCPHF+pGBKNS1]; M: DNA marker DL2000

酵母菌进行菌落 PCR 鉴定。结果见图 8 和图 9, 在待筛的 8 个克隆中都检测到了 *NSI* 和 *CPSF30* 基因, 说明这 8 个克隆中都含有 pGADCPHF 和 pGBKNS1 这两个质粒, 是阳性克隆, 命名为 AH109[pGADCPHF + pGBKNS1]。这些酵母模型菌株可用于后续的中药筛选。

5 中药筛选

通过初筛和复筛, 最终确定以下 4 种中药对 *NSI* 和 *CPSF30* 结合有抑制作用 (表 2)。其中双黄连口服液对 *NSI* 与 *CPSF30* 结合显示了较强拮抗活性, 不同厂家的双黄连口服液作用相近。蒲地蓝消炎口服液与金莲花胶囊也显示出拮抗活性, 蒲地蓝消炎口服液的作用与双黄连口服液相近, 金莲花胶囊作用较弱。

Table 2 The Chinese medicines with the inhibition of the binding of *CPSF30* to *NSI* protein

Drug	Formulation	IC ₅₀
Shuanghuanglian oral liquid*	Oral liquid	3.03 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$
Shuanghuanglian oral liquid*	Oral liquid	5.69 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$
Pudilan anti-inflammatory oral liquid	Oral liquid	5.21 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$
Jinlianhua capsule	Capsule	0.29 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
Shuanghuanglian capsule*	Capsule	0.19 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
Shuanghuanglian injection*	Powder injection	0.25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
Reduning injection	Injection	2.5 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$

*Indicate the different manufacturers of drugs

讨论

与分子水平的筛选相比, 酵母水平的筛选不需对目的蛋白进行纯化, 不仅简化了纯化步骤, 同时能保证目的蛋白的构象及所处的环境更接近天然的生理状态。与哺乳动物细胞水平的筛选相比, 酵母细胞容易培养、培养成本低, 操作方便, 而且对仪器设备没有特殊的要求。酵母双杂交技术是专门用于研究蛋白质间相互作用的一种技术, 经过 20 年的发展, 这种技术已经非常成熟, 它具有敏感性、真实性、简洁性和广泛性等优点。已经建立了大量的酵母双杂交筛选系统, 并取得了很大成就^[19-21]。因此, 本研究采用酵母双杂交系统建立了 NS1 和 CPSF30 相互作用的拮抗剂筛选模型。从 32 种中成药中筛选出 4 种对 NS1 和 CPSF30 结合有拮抗作用的中药, 为后续研究奠定了基础。

为克服酵母双杂交系统存在的“假阳性”, 双杂交宿主菌 AH109 的 α -半乳糖苷酶活性显阳性等缺点, 通过选择多个营养缺陷标记来尽量减少假阳性的产生。在检测 α -半乳糖苷酶活性时, 选择 AH109 空白菌株作为对照, 采用给药菌株 α -半乳糖苷酶活性和 AH109 空白菌株 α -半乳糖苷酶活性相减 (消除药物颜色本底), 得到药物对菌株 α -半乳糖苷酶活性真实的影响情况, 同时为了保证试验的准确, 挑选了 6 个酵母菌株, 每个菌株重复 3 次, 通过上述处理, 基本排除了菌株自身缺点对实验结果的影响。

本研究采用连续重叠 PCR 技术, 在较短的时间内克隆得到了 H1N1 病毒的 NS1 基因, 为将来快速克隆那些序列已知、但模板不容易得到的基因提供了一种思路。

References

[1] Bornholdt ZA, Prasad BV. X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13: 559-560.

[2] Burgui I, Aragón T, Ortín J, et al. PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes [J]. *J Gen Virol*, 2003, 84: 3263-3274.

[3] Delgadillo MO, Sáenz P, Salvador B, et al. Human influenza virus NS1 protein enhances viral pathogenicity and acts as an RNA silencing suppressor in plants [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85: 993-999.

[4] Enami M, Enami K. Characterization of influenza virus NS1 protein by using a novel helper-virus-free reverse genetic system [J]. *J Virol*, 2000, 74: 5556-5561.

[5] Bergmann M, Garcia-Sastre A, Carnero E, et al. Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication [J]. *J Virol*, 2000, 74: 6203-6206.

[6] Ehrhardt C, Wolff T, Pleschka S, et al. Influenza A virus NS1 protein activates the PI3k/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses [J]. *J Virol*, 2007, 81: 3058-3067.

[7] Hale BG, Jackson D, Chen YH, et al. Influenza A virus NS1 protein binds p85beta and activates phosphatidylinositol-3-kinase signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 14194-14199.

[8] Stasakova J, Ferko B, Kittel C, et al. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1 β and 18 [J]. *J Gen Virol*, 2005, 86: 185-195.

[9] Guo Z, Chen LM, Zeng H, et al. NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 36: 263-269.

[10] Min JY, Krug RM. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 7100-7105.

[11] Li ZJ, Jiang YP, Jiao PR, et al. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses [J]. *J Virol*, 2006, 80: 11115-11123.

[12] Nemeroff ME, Barabino SM, Li Y, et al. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs [J]. *Mol Cell*, 1998, 1: 991-1000.

[13] Noah DL, Twu KY, Krug RM. Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs [J]. *Virology*, 2003, 307: 386-395.

[14] Twu KY, Noah DL, Rao P, et al. The CPSF30 binding site on the NS1A protein of influenza A virus is a potential antiviral target [J]. *J Virol*, 2006, 80: 3957-3965.

[15] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions [J]. *Nature*, 1989, 340: 245-246.

[16] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (分子克隆实验指南) [M]. Jin DY, Li MF (translation). 2nd ed. Beijing: Science Press, 1992: 39-46, 100-106, 116-119, 133.

[17] Gietz RD, Schiestl RH. Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2: 35-37.

[18] Burke D, Dawson D, Stearns T. *Methods in Yeast Genetics*

- [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000: 103-107, 141-143.
- [19] Khazak V, Golemis EA, Weber L. Development of a yeast two-hybrid screen for selection of human Ras-Raf protein interaction inhibitors [J]. *Methods Mol Biol*, 2005, 310: 253-271.
- [20] Khazak V, Kato-Stankiewicz J, Tamanoi F, et al. Yeast screens for inhibitors of Ras-Raf interaction and characterization of MCP inhibitors of Ras-Raf interaction [J]. *Methods Enzymol*, 2006, 407: 612-629.
- [21] Kato-Stankiewicz J, Hakimi I, Zhi G, et al. Inhibitors of Ras/Raf-1 interaction identified by two-hybrid screening revert Ras-dependent transformation phenotypes in human cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 14398-14403.

关于评选第 13 届中国药学会-施维雅青年药物化学奖和专项研究资助项目的通知

中国药学会-施维雅青年药物化学奖和专项研究资助项目是由中国药学会与法国施维雅研究院共同设立的, 每年评选一次, 旨在鼓励中国优秀青年药物化学工作者立足于中国国内致力于新药研究。设奖十多年来, 有力推动了我国优秀青年药物化学工作者的健康成长和科学发展。第 13 届评选工作已经开始, 欢迎国内高等医药院校、科研机构积极推荐青年学者申报。

根据设奖宗旨和国内药物化学学科发展的实际情况, 2010 年的奖励办法为: (1) 继续面向全国, 奖励 3 名从事药物化学研究的青年药物化学 (合成药物和天然药物) 学者; 获奖者每人可获得奖金 15 000 元人民币以及奖杯和证书。(2) 面向边远地区的专项资助项目, 奖励 1 项研究课题, 经费为 50 000 元人民币, 二年内完成; 并颁发专项资助项目证书。(3) 如当年专项资助项目空缺, 则青年药物化学奖奖励名额为 5 名。奖金和专项研究经费均由法国施维雅研究院提供。

有关获奖候选人及专项研究资助项目申请人条件、评审材料报送要求和评审程序和颁奖时间等事宜可从中国药学会网站 (www.cpa.org.cn) 查询相关通知。

联系人和征集截止时间:

联系人: 孙文虹 (010-58699275-819)、鲁毅 (010-58699275-820)

地 址: 北京市朝阳区建外大街 4 号建外 SOHO 九号楼 18 层

邮 编: 100022 传真: 010-58699125

E-mail: sunwenhong2002@163.com

征集截止时间: 2010 年 4 月 30 日