

## 绿豆胰蛋白酶抑制剂对蛋白质前体加工酶的抑制活性

曲 梅<sup>1</sup>, 韩锦铂<sup>2</sup>, 孟延发<sup>1\*</sup>

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610061; 2. 同济大学蛋白质研究所, 上海 200031)

**[摘要]** **目的:**从绿豆中提纯天然的绿豆胰蛋白酶抑制剂(MBTI),并测定了它对前体加工酶的抑制活性。**方法:**通过硫酸铵沉淀、分子筛层析、离子交换、亲和层析和反相高压液相等一系列层析方法,纯化了MBTI;通过筛选得到两种蛋白质前体加工酶 Kexin 和 Furin 的高表达酵母菌株和 COS-7 细胞,用硫酸铵沉淀和分子筛的方法纯化这两种前体加工酶,并测定和计算 MBTI 对其的抑制活性。**结果:**纯化的 MBTI 在 HPLC 上洗脱为单峰,在 SDS-PAGE 中为单一条带。MBTI 对 Kexin 的抑制常数达到  $3.9 \times 10^{-9}$  mol/L,对 Furin 有一定的抑制活性,但是抑制活性较弱。**结论:**MBTI 对于 Kexin 和 Furin 两种蛋白前体加工酶都有抑制活性,尤其对 Kexin 抑制活性明显,如经进一步改造将有望成为理想的蛋白前体加工酶抑制剂。

**[关键词]** 绿豆胰蛋白酶抑制剂;前体加工酶;Kexin;Furin

**[中图分类号]** Q 814.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)03-0258-05

### Inhibition of proprotein convertases by mung bean trypsin inhibitor

QU Mei<sup>1</sup>, HAN Jin-bo<sup>2</sup>, MENG Yan-fa<sup>1\*</sup> (1. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610061, China; 2. Institute of Protein Research, Tongji University, Shanghai 200031)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To extract the mung bean trypsin inhibitor (MBTI) from mung bean and to study the inhibitory activity of MBTI against proprotein convertases (PCs). **Methods:** MBTI was purified to homogeneity by ammonium sulfate precipitation, sequential chromatography of gel filtration, ion exchange, affinity chromatography and HPLC. The high expression strains of 2 PCs, Kexin and Furin, were selected. Kexin and Furin were purified by ammonium sulfate precipitation and gel filtration. The inhibitory activity of MBTI against Kexin and Furin was assayed and the inhibitory constants (*K<sub>i</sub>*) of MBTI against the 2 PCs were calculated by Dixon's plot. **Results:** The purified MBTI showed a single peak on HPLC and a single band on SDS-PAGE. The inhibitory activity of MBTI against Kexin (*K<sub>i</sub>* =  $3.9 \times 10^{-9}$  mol/L) was stronger than that against Furin. **Conclusion:** MBTI can inhibit both Kexin and Furin, especially Kexin, and also can be an ideal inhibitor against PCs after further modification.

**[KEY WORDS]** mung bean trypsin inhibitor; proprotein convertases; Kexin; Furin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(3): 258-262]

前体加工酶属于丝氨酸蛋白酶家族的枯草杆菌蛋白酶亚家族,其催化机制与其他丝氨酸蛋白酶类似,活性中心由 Ser、His 及 Asp 组成,所以其他丝氨酸蛋白酶如胰蛋白酶的抑制剂有可能具有抑制前体加工酶的活性。由于前体加工酶在维持体内平衡和疾病发生中起着重要的作用,所以对前体蛋白加工酶抑制剂的寻找和研究将有利于人们找到广谱性的速效抗毒素抗病毒药物,为一些病毒性疾病的治疗开辟新的途径。

绿豆胰蛋白酶抑制剂(MBTI)属于 Bowman-Birk 类型抑制剂(简称 BBI)<sup>[1]</sup>,它的序列和结构均已经解出<sup>[2]</sup>,含有 72 个氨基酸残基,7 对二硫键,以 1:2 的摩尔分子比抑制胰蛋白酶,被认为是自然界里胰蛋白酶最有效的抑制剂之一。MBTI 第一个活性中心 Lys20(P1 位)及 P4 位的 Arg17 符合前体加工酶对底物及抑制剂活性位点的基本要求:P1、P4

位都是碱性残基,我们推测 MBTI 可能在一定程度上抑制前体加工酶的活性。为了验证这一推测,我们改进了文献<sup>[3]</sup>的方法,从绿豆中纯化了 MBTI 并测定了它对两种蛋白质前体加工酶 Kexin 和 Furin 的抑制活性。

### 1 材料和方法

1.1 材料、主要试剂和仪器 成熟绿豆(上海),市场购买。Sephadex G-50、DEAE-纤维素 52 购自 Phamacia 公司;荧光底物 Pyr-Arg-Thr-Lys-Arg-MCA 购自 Bachem 公司;表达质粒 pPICZ-C-KEX2 ΔCp 和 pCDNA3-Furin 由本实验室构建。Bio-Rad Mini II 型电泳仪和 Biologic LP 常压液相色谱仪为 Bio-

[作者简介] 曲 梅,硕士生。

\* Corresponding author. E-mail: qu\_mei@sym-bio. com. cn

Rad 产品; F-2500 荧光分光光度计为 Hitach 公司产品; 1100 系列高压液相色谱仪为安捷伦公司产品。

## 1.2 MBTI 的提取和纯化

### 1.2.1 MBTI 的初提<sup>[3]</sup>

成熟绿豆 100 g 在水中浸泡过夜,匀浆后硫酸调至 pH 2.0,离心(8 000×g, 20 min),上清液中缓慢加入 TCA 至终浓度 2.5% (V/V),静置 10 min 后于 75°C 水浴中加热 5 min,离心(8 000×g, 20 min),上清加入 75% 饱和度硫酸铵,将沉淀溶于适量 ddH<sub>2</sub>O 中。用 Sephadex G-50 分子筛层析(1.5 cm×100 cm)分离,流动相为 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5),流速 0.5 ml/min,分部收集活性峰。收集样品用 DEAE 离子交换层析(4 cm×10 cm),流速 1.0 ml/min。平衡缓冲液为 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5),然后用 0.3 mol/L NaCl 的 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)缓冲液洗脱。280 nm 检测,收集洗脱活性峰。

### 1.2.2 胰蛋白酶亲和层析

将上步样品液浓缩脱盐后上 SESA(对-β-硫酸酯乙酰胺苯胺)制备的固相胰蛋白酶亲和柱<sup>[4]</sup>,柱规格(1 cm×10 cm)。用 0.5 mol/L NaCl 洗脱非特异性吸附的蛋白质,用 0.05 mol/L HCl 洗脱结合于亲和柱上的蛋白,收集活性峰,弱碱调 pH 至 7.5,适当浓缩后脱盐。

### 1.2.3 反相 HPLC 层析

亲和层析后所得样品冻干后溶于 0.1% TFA 中,由安捷伦公司 C18 分析柱分析,流速 2 ml/min 洗脱流程:1~10 min, buffer A; 10~15 min, 0~30% buffer B; 15~30 min, 30~60% buffer B; 30~35 min, 60%~100% buffer B。其中,buffer B 为 70% 乙腈,0.1% TFA。收集活性峰,冻干。

### 1.2.4 SDS-PAGE

具体方法参照文献<sup>[5]</sup>,电泳完毕用考马斯亮蓝 R-250 染色。

## 1.3 蛋白质前体加工酶 Kexin 和 Furin 的获得

### 1.3.1 Kexin 的表达与纯化

pPICZ-C-KEX2ΔCp 转化甲醇酵母细胞,从含有 Zeocin(50 μg/ml)的 BM-GY 培养板上挑取阳性克隆接种于 MM(1.34% YNB, 4×10<sup>-5</sup> 生物素,0.5% 甲醇)板,同时将该克隆接种在 MD(1.34% YNB, 4×10<sup>-5</sup> 生物素,1% 葡萄糖)板同样的位置上,30°C 培养箱中培养 2 d。在两种板上均生长良好的克隆即为 Mut<sup>+</sup>的转化子。挑取携带外源基因表型为 Mut<sup>+</sup>的转化子接种于 YPD(1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose)培养基中 30°C 振荡培养 2 d 后沉淀菌体,更换培养基为 YPM(1%

yeast extract, 2% peptone, 0.5% methanol)后 30°C 继续振荡培养 2 d,取培养基测定 Kexin 活性,挑取酶活性高的菌株大量表达。表达上清用硫酸铵沉淀(75%饱和度),沉淀溶于 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 40 mmol/L Tris-HCl(pH 7.8)中,经 Sephadex G-50 分子筛层析(1.5 cm×100 cm),测活收集活性峰,合并多次收集活性峰,合并,置于-70°C 待用。

### 1.3.2 Furin 的表达与纯化

在含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中培养 COS-7 细胞。当细胞融合达到 60%~70% 时,用 Lipofectin 2000 试剂转染质粒 pCDNA3-Furin, 37°C 的 CO<sub>2</sub> 孵箱中继续培养 48 h,收集培养基,按文献<sup>[6]</sup>方法进行纯化。

### 1.4 Kexin/Furin 酶活性的测定

取不同浓度的 MBTI 先与固定量的 Kexin 或 Furin 酶液于缓冲液(100 mol/L HEPES, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.5% Triton X-100, 1 mmol/L β-巯基乙醇)混合后在 37°C 水浴中保温 5 min,加入荧光底物 Pyr-Arg-Thr-Lys-Arg-MCA 至终浓度为 20 nmol/L(Kexin)或 500 nmol/L(Furin),混匀后在 Hitach F-2500 荧光分光光度计上检测荧光基团的释放量。荧光激发波长和发射波长分别为 380 nm 和 460 nm。

#### 1.4.1 采用 Dixon 作图法确定 MBTI 对 Kexin 的抑制常数 $K_i$

在竞争性抑制时,改写米氏方程可得

$$\frac{1}{v} = a[I] + b \quad (1)$$

其中

$$a = \frac{K_m}{K_i \cdot v_{\max} [S]} \quad (2)$$

$$b = \frac{K_m + [S]}{v_{\max} [S]} \quad (3)$$

变化底物浓度 S,以  $\frac{1}{v}$  对 [I] 作图,可以得到一组斜率不同的直线。如底物浓度 S<sub>1</sub> 时,直线方程为  $\frac{1}{v} = a_1[I] + b_1$ ; 底物浓度 S<sub>2</sub> 时,方程为  $\frac{1}{v} = a_2[I] + b_2$ 。两直线交点的横坐标为  $\frac{b_2 - b_1}{a_2 - a_1}$ ,代入(2)、(3)式可得交点的横坐标为 -K<sub>i</sub>(如图 1 所示),根据 Dixon 作图法,分别测定底物为 20 nmol/L(S<sub>1</sub>)和 40 nmol/L(S<sub>2</sub>)时不同的 MBTI [I] 浓度下的 Kexin 酶反应初速度 [v],以  $\frac{1}{[v]}$  对 [I] 作图,测得 MBTI 对 Kexin 的抑制常数  $K_i$ 。

#### 1.4.2 MBTI 对 Furin 抑制活性的测定

所测定荧光基团的释放量即为前体加工酶的剩余活力,根

据不同抑制剂浓度下酶的剩余活力绘制抑制曲线,通过 Sigmaplot2000 软件拟合得到抑制剂  $IC_{50}$  (抑制酶活性 50% 时的抑制剂浓度), 并根据公式计算抑制常数  $Ki = \frac{IC_{50}}{1 + [S]/Km}$ , 公式中  $S$  为荧光底物浓度,  $Km$  为底物对酶的米氏常数 (pERTKR-MCA 对 Furin 为  $2.7 \mu\text{mol/L}$ )。

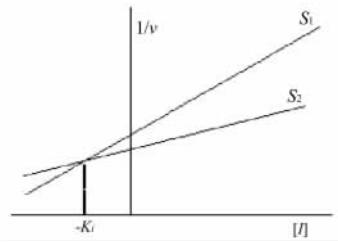


图 1 Dixon 作图法计算 MBTI 对 Kexin 的抑制常数  $Ki$  示意图

Fig 1 Calculation of inhibitory constant of MBTI against Kexin

## 2 结果

2.1 绿豆胰蛋白酶抑制剂的纯化 100 g 绿豆匀浆液经过浓硫酸抽提、TCA 冷热处理、硫酸铵沉淀、Sephadex G-50 分子筛层析、DEAE-纤维素 52 离子交换层析(图 2)、胰蛋白酶亲和柱层析(图 3)后所得产物由反相 HPLC 鉴定(图 4), 15% SDS-PAGE 鉴定(图 5), 纯化的 MBTI 在 HPLC 上洗脱为单峰, 在 SDS-PAGE 中为一条带。

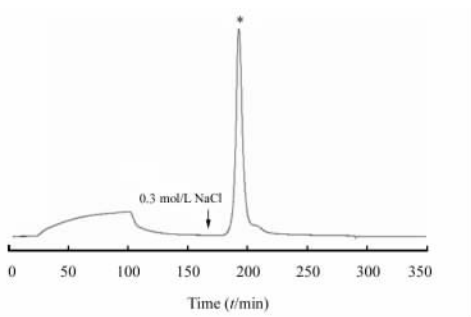


图 2 MBTI 经 DEAE-cellulose 52 纯化色谱图  
Fig 2 Chromatography of MBTI purified with DEAE-cellulose 52 anion exchange

DEAE column was pre-equilibrated with 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5; proteins were eluted with 0.3 mol/L NaCl in 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5. Proteins with inhibitory activity were marked with an asterisk

2.2 MBTI 对 Kexin 抑制常数测定 按照材料与方方法中所述取两组底物浓度  $S_1 = 20 \text{ nmol/L}$  和  $S_2 = 40 \text{ nmol/L}$ , 根据不同抑制剂浓度下酶的剩余活力的

倒数( $1/v$ )对抑制剂浓度  $[I]$  作图, 根据 Dixon 作图法, 两组底物浓度下所得曲线交点的横坐标即为  $-Ki$ , 如图 6 所示, 测得 MBTI 对 Kexin 抑制常数为  $Ki = 3.2 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 。

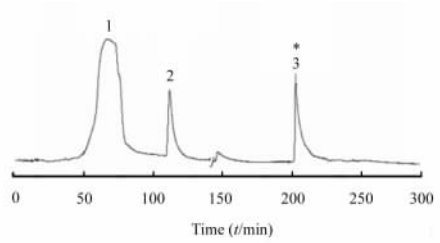


图 3 MBTI 经胰蛋白酶亲和层析纯化色谱图  
Fig 3 Chromatography of MBTI purified with immobilized trypsin affinity

Samples were loaded on the immobilized trypsin affinity column. Peak 1 was unbound proteins and peak 2 was proteins washed with 0.5 mol/L NaCl after sample loading. Proteins bond to the column were eluted with 0.05 mol/L HCl (peak 3). Eluted fraction possessing trypsin inhibitory activity was marked with an asterisk

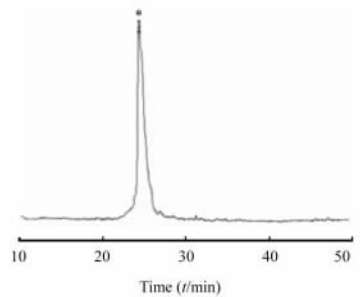


图 4 MBTI 经 HPLC 纯化色谱图  
Fig 4 Chromatography of MBTI purified with reverse-phase HPLC

The bound proteins were eluted by using a linear gradient of 0-30% acetonitrile (ACN) in 0.1% (V/V) TFA at a flow rate of 2 ml/min for 10-15 min, 30%-60% ACN in 0.1% (V/V) TFA at a flow rate of 2 ml/min for 15-30 min and 60%-100% ACN in 0.1% (V/V) TFA at a flow rate of 2 ml/min for 30-35 min. The elution was monitored at 280 nm, collected and assayed for inhibitory activity

2.3 MBTI 对于 Furin 活性抑制曲线及抑制常数的测定 抑制活性测定方法同 Kexin, 根据不同抑制剂浓度下酶的剩余活力绘制抑制曲线(图 7), 由抑制曲线得出  $IC_{50} = 3.9 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ , 根据底物浓度 500 nmol/L, 由公式计算得  $Ki = 3.9 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 。

## 3 讨论

许多蛋白质翻译合成之后要经过蛋白酶剪切及复杂的修饰之后才具有生物功能, 催化前体蛋白在特定的位点剪切成熟的酶被称为前体蛋白加工酶。

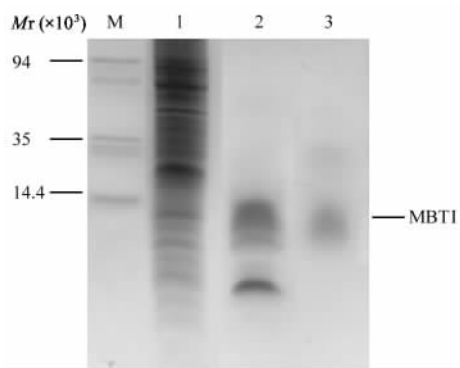


图5 MBTI纯化经15% SDS-PAGE鉴定图

Fig 5 The homogeneity of MBTI detected by SDS-PAGE

Proteins extracted from the mung bean (lane 1), the fractions eluted from DEAE column (lane 2) and trypsin affinity column (lane 3) were subjected to electrophoresis on 15% SDS-PAGE and visualized by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining

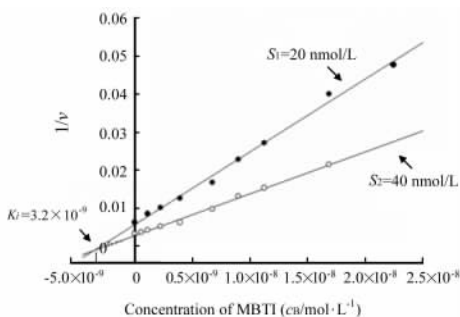


图6 Dixon作图法测定MBTI对Kexin的抑制常数

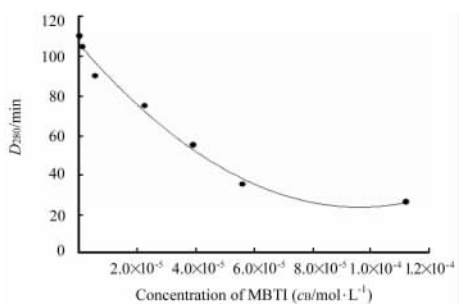
Fig 6 Calculation of  $K_i$  of MBTI against Kexin图7 以pERTKR-MCA为底物时  
MBTI对Furin的抑制曲线

Fig 7 The inhibitory curve of MBTI against Furin

The hydrolysis of the substrate Pyr-Arg-Thr-Lys-Arg-MCA was determined in the presence of various concentrations of MBTI using 500 nmol/L concentration of substrate

前体蛋白加工酶的底物非常广泛,包括生长因子、生长因子受体,血浆蛋白质(凝血因子、白蛋白),细胞外周质蛋白质等在生理功能上十分重要的蛋白质与多肽<sup>[7~10]</sup>;还包括病毒外壳蛋白(如艾滋病病毒外壳糖蛋白 gp160、埃博拉病毒外壳糖蛋白、疱疹病毒外

壳糖蛋白 gB 等)、细菌外毒素(炭疽毒素保护性抗原、白喉毒素等)等病理上十分关键的蛋白质<sup>[11]</sup>。由于前体加工酶在维持体内平衡和疾病发生中起着重要的作用,目前已经成为了抗毒素或者抗病毒的一个重要靶点,对前体蛋白加工酶抑制剂的寻找和研究将有利于人们找到广谱性的速效抗毒素抗病毒药物,为一些病毒性疾病的治疗开辟新的途径。

MBTI 属于 BBI 类型抑制剂,被认为是自然界里胰蛋白酶最有效的抑制剂之一,绿豆胰蛋白酶抑制剂的第一个活性中心 Lys20 (P1 位)及 P4 位 Arg17 符合前体蛋白加工酶对底物的基本要求:P1、P4 位都是碱性残基。本实验结果表明,天然绿豆胰蛋白酶抑制剂对前体加工酶 Kexin 具有较强的抑制活力,其  $K_i$  达到  $10^{-9}$  mol/L 水平,但对 Furin 的抑制活力较低。目前对于 Bowman-Birk 家族抑制剂的高级结构研究已经十分深入,Kexin 和 Furin 的晶体结构也于 2003 年被解出<sup>[12,13]</sup>。从 Kexin 与 Furin 对于同一个 eglin c 突变体的抑制常数的比较来看,它们通常相差两个数量级左右<sup>[14]</sup>。这两种酶对于同一种底物的米氏常数也相差一个数量级(pERT-KR-MCA:Furin 2.7  $\mu$ mol/L;Kexin 0.25  $\mu$ mol/L)。这些研究都从一个侧面反映出,尽管 Kexin 与 Furin 在底物识别模式方面有十分相似的特征,但高级结构上的微观差异仍然可以为酶提供对抑制剂或底物不同的敏感性。

目前已发现多肽类及蛋白类的一些前体加工酶抑制剂具有很好的抗细菌毒素、抗病毒感染及减慢恶性肿瘤迁移的活性。MBTI 相对于其他蛋白类抑制剂分子量较小,仅有 72 个氨基酸残基,十分有利于实验室阶段的研究工作,近年来 BBIs 类抑制剂<sup>[15~19]</sup>和胰蛋白酶的复合物的晶体结构都已解出,而 MBTI 和登革热病毒 Ns3-蛋白酶的复合物晶体结构的解出<sup>[20]</sup>,更说明 MBTI 在药物研究领域有很高的应用前景。

(致谢:感谢中国科学院生物化学与细胞生物学研究所戚正武院士对此工作的指导及支持)

## [参考文献]

- [1] Laskowski M Jr. Protein inhibitors of serine proteinases—mechanism and classification [J]. Adv Exp Med Biol, 1986, 199:1-17.
- [2] Zhang Y, Luo S, Tan F, et al. Complete amino acid sequence of mung bean trypsin inhibitor [J]. Sci Sin B, 1982, 25:268-277.
- [3] 屈贤铭,戚正武. 绿豆中两种小分子胰蛋白酶抑制剂的提取与结晶[J]. 生物化学与生物物理学报, 1963, 3:229-241.
- [4] 袁中一,钱雪明,虞安乐,等. 一种固定化酶的新载体-对氨基苯

- 砒乙基(ABSE-)交联琼脂[J]. 生物化学与生物物理学报, 1981,13:291-297.
- [5] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 79-82.
- [6] Cameron A, Appel J, Houghten RA, et al. Polyarginines are potent furin inhibitors [J]. J Biol Chem, 2000, 275: 36741-36749.
- [7] Bresnahan PA, Leduc R, Thomas L, et al. Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF *in vivo* [J]. J Cell Biol, 1990, 111(6 Pt 2):2851-2859.
- [8] Mondino A, Giordano S, Comoglio PM. Defective posttranslational processing activates the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor) [J]. Mol Cell Biol, 1991, 11:6084-6092.
- [9] Brennan SO, Nakayama K. Furin has the proalbumin substrate specificity and serpin inhibitory properties of an *in situ* hepatic convertase[J]. FEBS Lett, 1994, 338:147-151.
- [10] Wasley LC, Rehemtulla A, Bristol JA, et al. PACE/furin can process the vitamin K-dependent pro-factor IX precursor within the secretory pathway [J]. J Biol Chem, 1993, 268: 8458-8465.
- [11] Molloy SS, Anderson ED, Jean F, et al. Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis[J]. Trends Cell Biol, 1999, 9:28-35.
- [12] Holyoak T, Wilson MA, Fenn TD, et al. 2.4 Å resolution crystal structure of the prototypical hormone-processing protease Kex2 in complex with an Ala-Lys-Arg boronic acid inhibitor [J]. Biochemistry, 2003, 42: 6709-6718.
- [13] Stefan H, Angus C, Gleb PB, et al. The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity[J]. Nat Struct Biol, 2003, 10:520-529.
- [14] Fei H, Luo MJ, Ye YZ, et al. The inhibitory activities of recombinant eglin C mutants on Kexin and Furin, using site-directed mutagenesis and molecular modeling. [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2001, 33:591-599.
- [15] Tsunogae Y, Tanaka I, Yamane T, et al. Structure of the trypsin-binding domain of Bowman-Birk type protease inhibitor and its interaction with trypsin[J]. J Biochem(Tokyo), 1986, 100:1637-1646.
- [16] Lin GD, Bode W, Huber R, et al. The 0.25-nm X-ray structure of the Bowman-Birk-type inhibitor from mung bean in ternary complex with porcine trypsin[J]. Eur J Biochem, 1993, 212:549-555.
- [17] Koepke J, Ermiler U, Warkentin E, et al. Crystal structure of cancer chemopreventive Bowman-Birk inhibitor in ternary complex with bovine trypsin at 2.3 resolution. Structure basis of Janus-faced serine protease inhibitor specificity[J]. J Mol Biol, 2000, 298:477-491.
- [18] Park EY, Kim JA, Kim HW, et al. Crystal structure of the Bowman-Birk inhibitor from barley seeds in ternary complex with porcine trypsin[J]. J Mol Biol, 2004, 343:173-186.
- [19] Raj SS, Kibushi E, Kurasawa T, et al. Crystal structure of bovine trypsin and wheat germ trypsin inhibitor (I-2b) complex (2:1) at 2.3 Å resolution[J]. J Biochem (Tokyo), 2002, 132: 927-933.
- [20] Murthy HM, Judge K, DeLucas L, et al. Crystal structure of Dengue virus NS3 protease in complex with a Bowman-Birk inhibitor: implications for flaviviral polyprotein processing and drug design [J]. J Mol Biol, 2000, 301:759-767.
- [收稿日期] 2005-11-02 [修回日期] 2006-01-05  
[本文编辑] 曹静

### Small interfering RNA inhibits SARS-CoV nucleocapsid gene expression in cultured cells and mouse muscles

Zhao P, Qin ZL, Ke JS, Lu Y, Liu M, Pan W, Zhao LJ, Cao J, Qi ZT (Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] SARS-CoV is a newly identified coronavirus that causes severe acute respiratory syndrome (SARS). Currently, there is no effective method available for prophylaxis and treatment of SARS-CoV infections. In the present study, the influence of small interfering RNA (siRNA) on SARS-CoV nucleocapsid (N) protein expression was detected in cultured cells and mouse muscles. Four siRNA expression cassettes driven by mouse U6 promoter targeting SARS-CoV N gene were prepared, and their inhibitory effects on expression of N and enhanced green fluorescence protein (EGFP) fusion protein were observed. A candidate siRNA was proved to down-regulate N and EGFP expression actively in a sequence-specific manner. The expression vector of this siRNA was constructed and confirmed to reduce N and EGFP expression efficiently in both cultured cells and adult mouse muscles. Our findings suggest that the siRNA should provide the basis for prophylaxis and therapy of SARS-CoV infection in human.

[FEBS Lett, 2005, 579: 2404-2410]