



山西大学
SHANXI UNIVERSITY

2024 届硕士学位论文

新冠病毒 NSP5 切割 对 NSP7 与宿主互作的影响研究

作者姓名 牛嘉慧

指导教师 李建国 副教授

学科专业 微生物学

研究方向 感染与免疫

培养单位 生物技术研究所

学习年限 2021 年 9 月至 2024 年 6 月

二〇二四年六月

山西大学

2024 届硕士学位论文

新冠病毒 NSP5 切割
对 NSP7 与宿主互作的影响研究

作者姓名 牛嘉慧

指导教师 李建国 副教授

学科专业 微生物学

研究方向 感染与免疫

培养单位 生物技术研究所

学习年限 2021 年 9 月至 2024 年 6 月

二〇二四年六月

Thesis for Master's degree, Shanxi University, 2024

SARS-CoV-2 NSP5 protease cleavage NSP7 and
a study on effect of interaction between the host and
NSP7 cleavage products

Student Name Jia-hui Niu

Supervisor Prof. Jian-guo Li

Major Microbiology

Specialty Infection and immunity

Department Institute of Biotechnology

Research Duration 2021.09-2024.06

June, 2024

摘要

新冠(COVID-19)给世界的经济增长和人们的身心健康造成了不可估量的负面影响。大量的研究表明免疫病理损伤，尤其是以高水平的外周细胞因子为特征的细胞因子风暴可能是导致新冠感染者死亡的罪魁祸首，但病毒感染的病理机制尚未完全研究清楚。NSP5 是糜蛋白样蛋白酶，可以切割多种蛋白。在切割宿主蛋白方面，NSP5 通过切割多种宿主蛋白在多点破坏细胞以增强复制和感染同时迅速抑制抗病毒反应。在切割病毒自身蛋白方面，其与 NSP3 切割 pp1a 和 pp1ab 产生 16 种非结构蛋白参与新冠病毒复制与转录过程。本文根据 NSP5 的特异性切割位点，推测 NSP7 可能有两个切割位点 Q18 和 Q34。将假设的两个切割位点在不同冠状病毒中进行比对，发现 NSP7 同时存在两个酶切位点可能与 SARS 和新冠病毒的强致病性相关。鉴此，为拓展对新冠病毒 NSP7 功能的认识，本课题首次确认 NSP5 可以切割 NSP7，进一步研究新冠病毒 NSP5 切割 NSP7 对病毒蛋白与宿主细胞互作的影响，尝试揭示新冠病毒 NSP7 的非经典形式及其功能。

本课题首先从新冠病毒 NSP5 是否切割 NSP7 入手，由于 NSP7 的分子质量较小，因此选用带 GFP 标签的 NSP7 过表达载体研究切割产物。NSP5 切割带 GFP 标签的 NSP7 时，随着 NSP5 量逐渐增加，NSP7 的量逐渐减少，且检测到在 Q18 处切割的预测切割条带。当用 GC376 处理后，主带不呈现递减趋势，初步证明 NSP5 切割 NSP7。接下来用 NSP5 的失活突体验证切割，NSP5 失活突变体的量逐渐增加时 NSP7 不存在递减趋势，确证 S2 NSP5 切割 S2 NSP7。为研究细胞内蛋白降解途径对上述切割的影响，分别选用针对三种降解途径的抑制剂，MG132 作为蛋白酶体降解途径的抑制剂，Z-VAD(OMe)-FMK 作为胱天蛋白酶(caspase)途径蛋白降解的抑制剂，Bafilomycin-A1 作为自噬-溶酶体蛋白降解途径的抑制剂，发现 Bafilomycin-A1 作用后 NSP7 主带的量不随 NSP5 增加而减少，且 NSP5 对 NSP7 的切割使自噬相关基因 LC3 表达上升，提示切割可能促进自噬体的形成，但具体的分子机制仍不明确。综上证实新冠病毒 NSP5 切割 NSP7，切割位点可能是 Q18 和 Q34，自噬-溶酶体蛋白降解途径可能影响 NSP5 对 NSP7 的切割。

在论证新冠病毒 NSP5 切割 NSP7 的基础上，本文继续研究 S2 NSP5 在 S2 NSP7 上的切割位点，揭示 NSP5 切割 NSP7 的分子机制。将 NSP7 的 Q 位点同时突变为 A 后 NSP7 主带的量依旧随 NSP5 增加而减少，提示存在其他位点。将

NSP7 的 Q 和 E 位点全突变，与预期一致，突变 EQ 位点后不再切割，证明切割位点确实是 E 或 Q 位点。由于细胞中存在多种复杂因素影响，因此通过原核表达纯化获得纯蛋白，利用无细胞酶切检测 NSP7 的切割条带，初步确定 NSP5 切割 NSP7 的分子作用机制。尿素胶结果表明 NSP7 与 NSP5 反应后在 6.5kD 和 3.3kD 处出现切割条带；WB 结果显示 NSP5 在 NSP7 上至少存在三个切割位点产生 4 个切割产物，根据切割产物的相对分子质量推测第一个切割位点可能是 18Q、19Q 和 23E，第二个切割位点是 47E，第三个切割位点可能是 73E 或者 74E。上述结果明确 NSP5 通过多个酶切位点产生至少 4 个切割产物，为 NSP7 功能的进一步研究提供了理论基础。

在发现 S2 NSP7 被 S2 NSP5 切割形成的切割产物基础上，本课题进一步研究 NSP7 切割产物的亚细胞定位和功能。共定位结果显示 NSP7 主要定位于细胞质，在 NSP5 切割后形成的切割产物定位于细胞核。生物素-链亲和素标记细胞膜蛋白结果表明少量 NSP7 定位于细胞膜，当 NSP5 切割 NSP7 后，定位于细胞膜的 NSP7 消失。切割产生的 NSP7 切割片段与 NSP7 有不同的定位，这可能赋予了 NSP7 切割产物区别于 NSP7 的功能。体外 T 细胞激活实验表明，NSP7 切割产物可能对 T 细胞活性的抑制效果更强。

综上所述，本课题首次证实新冠病毒 NSP5 切割 NSP7，NSP7 上至少存在三个 NSP5 的酶切位点，产生至少四个条带，且切割位点可能为 18Q、19Q、23E、47E、73E、74E；切割产物对 T 细胞激活的抑制活性强于 NSP7。

关键词：SARS-CoV-2；NSP7；NSP5；NSP7 切割产物；蛋白-蛋白相互作用

ABSTRACT

COVID-19 has caused immeasurable negative effects on world economic growth and people's physical and mental health. A large number of studies shown that immunopathological damage, especially the cytokine storm characterized by high levels of peripheral cytokines, may be the main cause of death of COVID-19 infected people, but the pathological mechanism of viral infection has not been fully studied. NSP5 is a chymotrypsin like protease that can cleave various proteins. In terms of cleaving host proteins, NSP5 enhances replication and infection while rapidly inhibiting antiviral responses by cleaving multiple host proteins and disrupting cells at multiple points. In terms of cutting the virus's own protein, it cleaves pp1a and pp1ab with NSP3 to produce 16 non structural proteins that participate in the replication and transcription of SARS-CoV-2. Based on the specific cleavage sites of NSP5, this article speculates that NSP7 may have two cleavage sites Q18 and Q34. The two putative cleavage sites were compared in different coronaviruses, and it was found that the presence of two cleavage sites in NSP7 might be related to the strong pathogenicity of coronavirus. In view of this, in order to expand the understanding of the function of SARS-CoV-2 NSP7, this work confirmed that NSP5 can cleave NSP7 for the first time, further studied the impact of SARS-CoV-2 NSP5 cleaving NSP7 on the interaction between viral protein and host cells, and tried to reveal the non classical form and function of SARS-CoV-2 NSP7.

This thesis starts with whether SARS-CoV-2 NSP5 cleaves NSP7. Because of the small molecular weight of NSP7, we choose NSP7 overexpression vector with GFP tag to study the cutting product. When NSP5 cuts NSP7 with GFP labels, as the amount of NSP5 gradually increases, the amount of NSP7 gradually decreases, and a predicted cleaving strip cut at Q18 is detected. After treatment with GC376, the main band did not show a decreasing trend, which preliminarily proves that NSP5 cleaves NSP7. Next, the inactivation mutation of NSP5 was used to demonstrate cleavage. As the number of NSP5 inactivated mutants gradually increased, there was no decreasing trend in NSP7, confirming that S2 NSP5 cleaves S2 NSP7. To investigate the impact of intracellular protein degradation pathways on the aforementioned cleavage, inhibitors targeting three degradation pathways were selected. MG132 was chosen as the inhibitor of proteasome

degradation pathway, Z-VAD (OMe) - FMK as the inhibitor of caspase pathway protein degradation, and Bafilomycin-A1 as the inhibitor of autophagy lysosomal protein degradation pathway. It was found that the amount of NSP7 main band did not decrease with the increase of NSP5 after the action of Bafilomycin-A1, and NSP5's cleavage of NSP7 increased the expression of autophagy related gene LC3, suggesting that cleavage may promote the formation of autophagosomes. However, the molecular mechanism of the specific body is still unclear. To sum up, it can be preliminarily confirmed that SARS-CoV-2 NSP5 cleaves NSP7, and the cleavage sites may be Q18 and Q34. The autophagy lysosomal protein degradation pathway may affect the cutting of NSP7.

On the basis of demonstrating that SARS-CoV-2 NSP5 cleaves NSP7, this paper continues to study the cleavage site of S2 NSP5 on S2 NSP7 to reveal the molecular mechanism of NSP5 cleaving NSP7. After simultaneously mutating the Q site of NSP7 to A, the amount of the main band of NSP7 still decreased with the increase of NSP5, indicating the presence of other sites. Mutate the Q and E sites of NSP7 as expected, and no longer cleave the EQ site after mutation, proving that the cleavage site is indeed the E or Q site. Due to the presence of various complex factors in cells, pure proteins were obtained through prokaryotic expression and purification. The cleavage bands of NSP7 were detected using cell-free enzyme digestion to preliminarily determine the molecular mechanism of NSP5 cutting NSP7. The urea gel results showed that cutting bands appeared at 6.5 kD and 3.3 kD after the reaction between NSP7 and NSP5; The WB results show that NSP5 has at least three cleavage sites on NSP7, producing four cleavage products. Based on the relative molecular weight of the cleavage products, it is speculated that the first cleavage site may be 18Q, 19Q, and 23E, the second cleavage site may be 47E, and the third cleavage site may be 73E or 74E. The above results clearly indicate that NSP5 produces at least 4 cleavage products through multiple cleavage sites, providing a theoretical basis for further research on the function of NSP7.

On the basis of discovering the cleavage products formed by S2 NSP7 being cleaved by S2 NSP5, this study further investigates the subcellular localization and function of NSP7 cleavage products. The colocalization results showed that NSP7 was mainly localized in the cytoplasm, and the cleavage products formed after NSP5

cleavage were localized in the nucleus. The labeling of cell membrane proteins with biotin chain avidin showed that a small amount of NSP7 was localized on the cell membrane. When NSP5 cleaved NSP7, the NSP7 localized on the cell membrane disappeared. The change in the localization of NSP7 after cutting indicates that cutting can affect the subcellular localization of NSP7. This may be due to the different localization of the NSP7 cutting fragment produced by cutting compared to NSP7, which may endow the NSP7 cutting product with a distinct function from NSP7. In vitro T cell activation experiments have shown that NSP7 cleavage products may have a stronger inhibitory effect on T cell activity.

To sum up, this thesis confirmed for the first time that SARS-CoV-2 NSP5 cleaves NSP7, and there are at least three NSP5 cleavage sites on NSP7, producing at least four bands, and the cleavage sites may be 18Q, 19Q, 23E, 47E, 73E, 74E; The inhibitory activity of cutting products on T cell activation is stronger than that of NSP7.

Keywords: SARS-CoV-2; NSP7; NSP5; NSP7 cleavage products; Protein-protein interaction

目 录

1 文献综述.....	1
1.1 冠状病毒简介.....	1
1.1.1 冠状病毒基因组结构.....	1
1.1.2 冠状病毒分类.....	2
1.1.3 新冠病毒的基因复制及转录.....	3
1.1.4 新型冠状病毒致病机理研究现状.....	4
1.2 新冠病毒 NSP5 切割多种蛋白.....	6
1.2.1 新冠病毒 NSP5 的结构及分子作用机制.....	6
1.2.2 新冠病毒 NSP5 切割宿主蛋白.....	6
1.2.3 新冠病毒 NSP5 切割病毒自身蛋白.....	7
1.3 新冠病毒 NSP7 的研究进展.....	9
1.3.1 新冠病毒 NSP7 的结构.....	9
1.3.2 新冠病毒 NSP7 的功能.....	9
1.4 SARS-CoV-2 的蛋白非经典形式.....	12
1.5 选题的目的和意义.....	13
2 新冠病毒 NSP5 对 NSP7 切割的初探.....	14
2.1 引言.....	14
2.2 材料.....	14
2.2.1 细胞、菌株.....	14
2.2.2 质粒.....	14
2.2.3 试剂.....	15
2.2.4 试剂配制.....	16
2.2.5 实验仪器.....	17
2.3 方法.....	17
2.3.1 质粒转化.....	17
2.3.2 无缝克隆构建载体.....	17
2.3.3 HEK-293T 细胞转染.....	20
2.3.4 蛋白提取.....	20
2.3.5 免疫印记.....	21
2.3.6 HEK-293T RNA 提取.....	22
2.3.7 反转录.....	22
2.3.8 实时荧光定量 PCR.....	23
2.4 实验结果.....	25
2.4.1 质粒构建.....	25

2.4.2 S2 NSP7 的预测切割位点与致病性	26
2.4.3 SARS-CoV-2 中 NSP7 的切割	26
2.4.4 S2 NSP5 失活突变验证切割	28
2.4.5 细胞内蛋白降解途径对 S2 NSP5 切割 S2 NSP7 的影响	28
2.5 讨论与小结	30
3 新型冠状病毒 NSP5 切割 NSP7 的酶切位点及切割产物	32
3.1 引言	32
3.2 材料	32
3.2.1 细胞、菌株	32
3.2.2 质粒	32
3.2.3 试剂	32
3.2.4 实验仪器	33
3.2.5 试剂配制	33
3.3 方法	34
3.3.1 质粒构建	34
3.3.2 尿素胶的制作	36
3.3.3 原核表达纯化	36
3.3.4 无细胞酶切	37
3.4 实验结果	37
3.4.1 S2 NSP7 突变体质粒构建	37
3.4.2 S2 NSP7 预测切割位点突变验证	38
3.4.3 S2 NSP5 及 S2 NSP7 原核表达质粒构建	40
3.4.4 S2 NSP5 与 S2 NSP7 的原核表达纯化	40
3.4.5 S2 NSP5 与 S2 NSP7 的无细胞酶切	41
3.5 讨论与小结	42
4 S2 NSP5 切割 S2 NSP7 产生的切割产物的亚细胞定位	43
4.1 引言	43
4.2 材料	43
4.2.1 细胞、菌株	43
4.2.2 质粒	43
4.2.3 试剂	43
4.2.4 试剂配制	44
4.2.5 实验仪器	45
4.3 方法	45
4.3.1 细胞免疫荧光	45
4.3.2 细胞膜蛋白检测	46
4.3.3 细胞外蛋白检测	47
4.4 实验结果	47

4.4.1 新冠病毒 NSP7 切割产物的亚细胞定位	47
4.4.2 新冠病毒 NSP7 在细胞膜的检测	48
4.4.3 新冠病毒 NSP7 在细胞外的检测	49
4.5 讨论与小结	49
5 新型冠状病毒 NSP7 切割产物功能的初步研究	51
5.1 引言	51
5.2 材料	51
5.2.1 细胞、菌株	51
5.2.2 质粒	51
5.2.3 试剂	51
5.2.4 实验仪器	52
5.3 方法	52
5.3.1 亲和纯化-质谱联用技术(IP-MS)	52
5.3.2 质谱数据分析	53
5.3.3 互作蛋白质载体构建	53
5.3.4 免疫共沉淀(Co-IP)	54
5.3.5 流式细胞术	55
5.4 实验结果	55
5.4.1 IP-MS 筛选 NSP7 切割产物的互作蛋白	56
5.4.2 互作蛋白载体构建	56
5.4.3 Co-IP 验证 NSP7 切割片段与互作蛋白互作	57
5.4.4 新型冠状病毒 NSP7 及其切割产物对 T 细胞活性的影响 ..	58
5.5 讨论与小结	60
6 总结与展望	61
6.1 主要结论	64
6.2 展望	65
参考文献	66

1 文献综述

1.1 冠状病毒简介

1.1.1 冠状病毒基因组结构

冠状病毒的基因组大小在 27.3 (HCoV-229E)和 31.3 (MHV) kb 之间是目前已知最大的 RNA 病毒基因组^[1-3], 通常在 26-32kb, 其为线性单链正义 RNA, 具有 5'帽结构和 3'多聚 A 尾结构^[4]。冠状病毒基因组 5'端约三分之二用于编码介导病毒 RNA 合成的病毒复制酶^[5-6]。复制酶基因由两个大的开放阅读框组成, 分别为 ORF1a 和 ORF1b, 它们位于基因组 5'末端^[7]。病毒进入后, 两个大的开放阅读框 ORF1a 和 ORF1b 随即被翻译为多聚蛋白 pp1a 和 pp1ab^[8], 而后其通过蛋白酶水解成约 16 种非结构蛋白。pp1ab 的一半由 C 末端 ORF1b 编码, 这在翻译过程中需要 (-1)核糖体移码 (-1 ribosomal frameshift; -1 PRF)^[7]产生 pp1ab 移码产物, 且该移码机制可能会为 ORF1a 编码的非结构蛋白积累足够高的浓度赢得时间, 从而使宿主细胞的先天免疫反应丧失能力^[9-10]。高度保守的 NSP5 蛋白是冠状病毒的主要蛋白酶, 其作为一种糜蛋白酶 (也被称为 3C 样蛋白酶, 3CL^{pro}), 对病毒加工和成熟至关重要。主蛋白酶就像剪刀一样, 与具有木瓜蛋白酶活性的 NSP3 将 pp1a 和 pp1ab 两个多聚蛋白水解为 16 种非结构蛋白^[11-14]。3CL^{pro} 分别在 7 个和 11 个保守位点处分别切割 pp1a 和 pp1ab 释放 NSP4-NSP11 和 NSP4-NSP16^[14]。NSP3 是冠状病毒产生的最大的多结构域蛋白, 其在 pp1a 和 pp1ab 都有 3 个酶切位点水解释放 NSP1-NSP4^[11]。这些非结构蛋白一旦从 pp1a 和 pp1ab 中释放出来, 将会组装成膜结合的核糖核蛋白复合体 (即复制和转录复合体; RTC), 驱动不同形式病毒 RNA 的合成。冠状病毒基因组 3'端约三分之一编码结构蛋白和辅助蛋白。结构蛋白包括 S 蛋白、N 蛋白、M 蛋白、E 蛋白^[16]。S 蛋白是一种跨膜蛋白, 其氨基末端 S1 结构域负责识别细胞受体, 羧基末端 S2 结构域介导随后的膜融合过程^[17]。N 蛋白则通过非共价键将冠状病毒 RNA 包裹起来形成核衣壳^[18]。包膜蛋白(E) 负责生成包膜曲度和成熟病毒颗粒包膜的最终切断, 膜蛋白(M) 负责营养物质的跨膜运输, 并参与病毒的出芽释放以及病毒外包膜的形成^[19]。如图 1.1, 以新冠病毒为例, 简要展示冠状病毒的基因组结构。此外, 不同冠状病毒的辅助蛋白略有不同, 比如新冠病毒基因组编码 6 种辅助蛋白分别为 ORF3a、ORF6、ORF7a、ORF7b、

ORF8 和 ORF10 等^[20]。

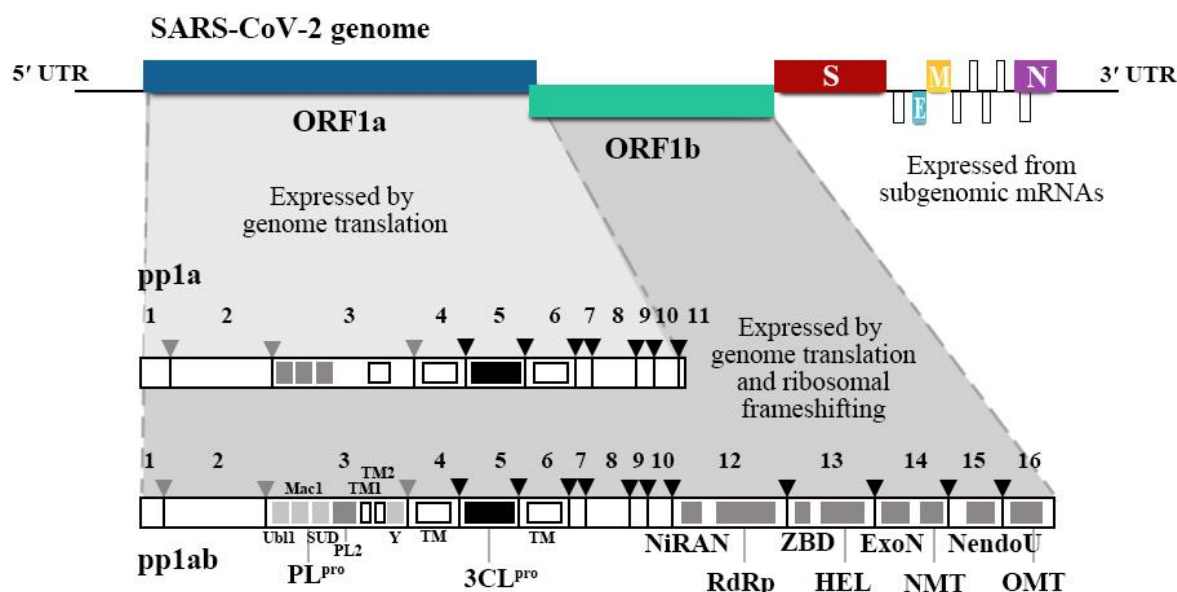


图 1.1 新冠病毒冠状病毒的基因组结构和编码蛋白

Figure1.1 Genome structure and coding potentials of SARS-CoV-2

1.1.2 冠状病毒分类

冠状病毒具有包膜结构，上面有三种蛋白。由于其刺突像王冠，因此被称为冠状病毒。根据 ICTV 病毒分类学分类，冠状病毒在病毒的系统分类中归为尼多病毒目(Nidovirales)、冠状病毒科(Coronaviridae)、冠状病毒属 (Coronavirus)^[17]。根据系统发育树，冠状病毒可分为四个属： α 、 β 、 γ 、 δ ，可感染包括人类在内的许多动物物种^[22]。许多表现出高度的种间转移，因此是重要的人畜共患病病原体。蝙蝠和鸟类被认为是人类冠状病毒人畜共患病感染的“天然宿主”^[23-25]。2019 年 12 月肺炎爆发并在全球蔓延，COVID-19 的病原体很快被确定作为一种新型冠状病毒，即严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2)^[26-27]，新冠肺炎大流行对人类的生命和社会发展造成了严重危害。截至目前，人类冠状病毒(hCoV)共有 7 种，包括 2 种甲型冠状病毒 hCoV- 229E 和 hCoV- NL63, 5 种乙型冠状病毒 hCoV- HKU1、hCoV- OC43、SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2。hCoV- 229E、hCoV- NL63、hCoV- OC43 和 hCoV- HKU1 感染的患者仅表现为普通感冒^[28]。然而，SARS- CoV、MERS-CoV 和 SARS- CoV-2 导致严重急性呼吸综合征(SARS)^[29]。蝙蝠是大多数冠状病毒的宿主，这些病毒可能通过中间宿主传播给人类，如果子狸

(SARS-CoV)^[30]或骆驼(MERS-CoV)^[31]。

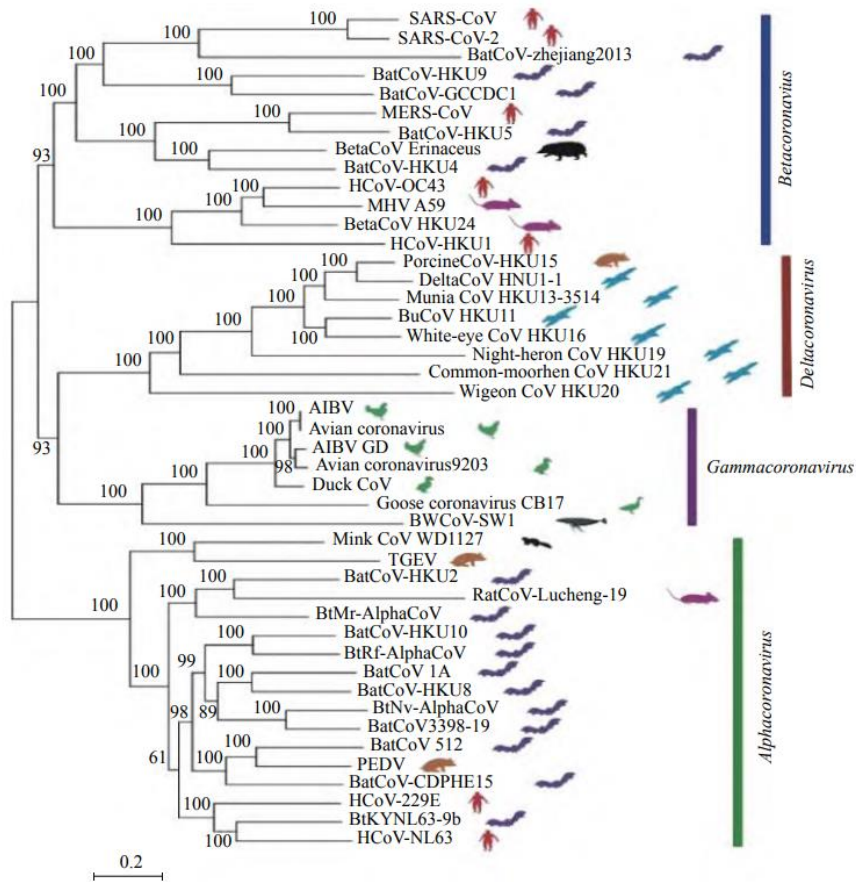


图 1.2 冠状病毒的分类^[5]

Figure1.2 Overall Structure of the SARSCoV-2 Core Polymerase Complex^[5]

1.1.3 新冠病毒的基因复制及转录

SARS-CoV-2 感染时通过 S 蛋白与宿主细胞受体 ACE2 的相互作用使病毒颗粒附着于靶细胞^[33-35]。TMPRSS2 对 S 蛋白的蛋白水解裂解导致 S 蛋白的结构改变，引发病毒与宿主膜的融合，并将病毒 gRNA 释放到细胞质中。ACE2 和 TMPRSS2 在许多细胞类型中都有表达，在肺、肠上皮细胞和内皮细胞中表达量特别高，这使得 SARSCoV-2 能够靶向许多重要器官^[36-37]。作为一种 RNA 病毒，SARS-CoV-2 只在被感染细胞的细胞质中复制。如图 3.3 所示，病毒基因组在细胞质中首先被细胞蛋白酶从病毒 N 蛋白中释放，随后病毒+gRNA 直接作为 ORF1a 和 ORF1b 翻译的 mRNA，也作为 -RNA 转录的模板 RNA。由 ORF1a 和 ORF1b 翻译产生的两个多聚蛋白 pp1a 和 pp1ab 水解后释放 16 种非结构蛋白组装成复制转录复合物 (replication and transcription complex ;RTC)。RTC 用于病毒 gRNA 转录和由病毒

感染诱导的 DMVs 内的 sgRNA 合成^[39-40]。从 DMVs 释放的新合成的 sgRNA 编码病毒结构蛋白和辅助蛋白。最后，新生成的 gRNA 被 N 蛋白包裹，被病毒包膜包裹并从感染细胞中释放^[41-42]。病毒诱导细胞膜内陷和过度的膜重塑形成双膜囊泡（double-membrane vesicles; DMVs）^[43]，这使得病毒转录被限制在病毒 Nsps 和宿主因子集中的 DMVs 中。DMVs 内部新形成的 RTC 通过- gRNA 合成病毒 +gRNA 和大量+ sgRNA，DMVs 的角色相当于一个物理间隔小室，为病毒 RNA 与细胞质中的免疫传感器的分隔，以逃避宿主的先天免疫^[38]。

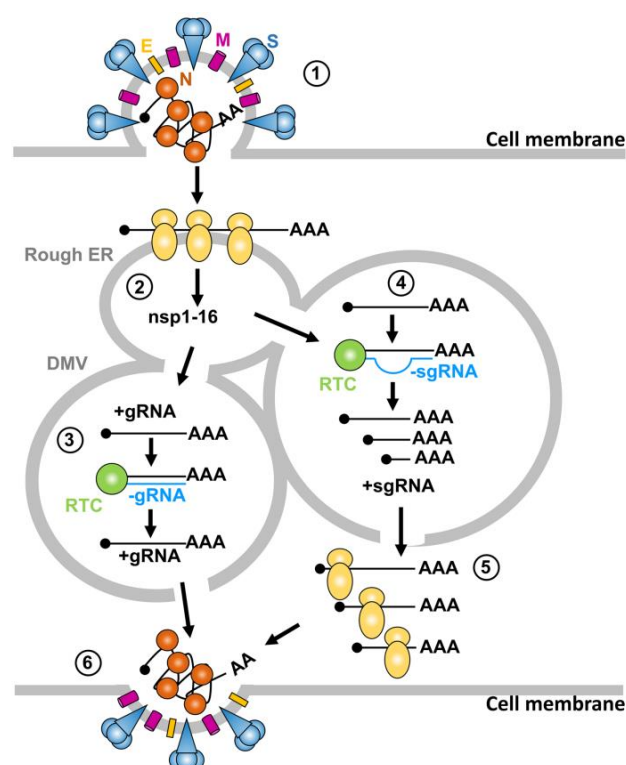


图 1.3 冠状病毒的复制与转录^[38]

Figure1.3 Coronavirus genome replication and transcription. ^[38]

注：①S 蛋白与 ACE2 互作病毒颗粒附着于靶细胞，gRNA 释放到细胞质；②+ gRNA 翻译出 NSP1-16；③RTC 合成 gRNA；④RTC 合成 sgRNA；⑤sgRNA 翻译病毒结构蛋白和辅助蛋白；⑥病毒包装并释放；

1.1.4 新型冠状病毒致病机理研究现状

上小节已经提到，新冠病毒的 S 蛋白通过与 ACE2 结合进入宿主细胞，合成其所需的核酸和蛋白质并组装后，病毒通过囊泡运输到宿主细胞膜，并通过胞吐作用释放^[44]。当 S 蛋白被运送到细胞表面时，它能使被感染的细胞和健康的细胞融合，从而形成大的多核细胞，在宿主生物中传播病毒^[44-46]。三种强致病性人冠

状病毒 SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 的一个共同特征是它们可以在下呼吸道复制并引起致命性肺炎^[47-49]。随着急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的发展,死亡的可能性急剧增加^[47]。在这种情况下,病毒在体内扩张、缺氧、组织腐烂产物进入血液、T 细胞和巨噬细胞的病理性过度活化、白细胞、补体系统的血管内活化和止血导致一系列与全身性炎症病理相关的复苏综合征^[48-52]。COVID-19 的潜伏期为 3 - 14 天,取决于免疫状态^[46]。COVID-19 的典型症状包括疲劳、发热、干咳、不适、喉咙痛、味觉和/或嗅觉丧失,在某些情况下还会出现呼吸急促、腹泻和病毒性肺炎的特征性体征^[53]。此外,包括冠状病毒在内的病毒致病性的一个共同模式是,它们能够抑制 INF-I 和 IFN-III 的产生和功能,从而触发数百个 IFN 刺激基因(ISG)^[54-56]。病毒对免疫能力细胞的细胞应激激活机制的影响也很显著,因为它会导致淋巴细胞(主要是 T 细胞)的多克隆激活和凋亡,巨噬细胞的病理激活和免疫抑制^[57]。

新冠病毒主要采用以下三种常规的病毒致病策略^[44]:

(1) 病毒与细胞受体的相互作用,这些受体包括入侵细胞相关的受体,传递对病毒有用信息的受体和启动抗病毒反应的受体(病毒通过抑制这些受体及其信号通路启动抗病毒反应);

(2) 抑制来自被感染靶细胞和宿主机体免疫系统的抗病毒反应。例如抑制 INF-I 和 IFN-III 的早期抗病毒作用、破坏普遍细胞应激信号通路或特定免疫通路和保护病毒免受抗病毒反应因子的直接作用;

(3) 病毒以自身免疫和自身炎症过程的形式引发免疫系统攻击其组织;

众所周知,新冠肺炎重症患者的主要并发症是急性呼吸窘迫综合征(ARDS),是由于病毒诱导机体产生强烈的免疫应答和炎症反应,形成细胞因子风暴导致的。研究发现重症 COVID-19 早期血液中 IFN-I 水平较低,而在晚期血液中 IFN-I 水平升高^[58]。SARS-CoV-2 的致病性因子可以抑制 IFN 保护的所有主要阶段,病毒感染期间 IFN 的合成是雪崩式的。与较轻形式的 COVID-19 患者相比,病程严重的患者中 IFN-I 和 IFN- λ 2 的表达要高得多^[59]。在上呼吸道有效地启动干扰素的产生会使病毒清除,并可限制病毒向下呼吸道的传播。但病毒在上呼吸道系统中逃脱免疫控制时,肺部中大量增加的 IFN 的产生可能会导致细胞因子风暴和组织损伤。T 淋巴细胞减少症可能也是造成细胞因子风暴的原因之一。新冠肺炎中轻中型患者中效应 T 细胞表现出更强的细胞杀伤毒性和更低的耗竭状态,但在重症患者中效应 T 细胞展现出更高的耗竭状态^[60-62]。

1.2 新冠病毒 NSP5 切割多种蛋白

1.2.1 新冠病毒 NSP5 的结构及分子作用机制

如图 1.4 所示 SARS-Co V-2 nsp5 的结构主要由三部分构成，分别为结构域 I、II 和螺旋域 III 组成^[90]。结构域 III 由 5 个 α -螺旋组成，其表面存在空腔，由残基 Cys145 和 His41 组成的非典型催化二联体位于活性位点的空腔中，且两侧都有 I 和 II 结构域的残基^[90]。SARS-CoV-2 主蛋白酶以二聚体的活性形式发挥作用，两个单聚体中任一个单体的 N 端 finger 结构能与另一个单聚体的 Glu166 相互作用，从而帮助形成 S1 底物结合位点的口袋^{[86][90]}。NSP5 的 P1 位点有一个保守的 Gln 残基，P2 和 P1'位点分别有疏水(Leu、Pro 或 Val)残基和脂肪族(Ser、Asn 或 Ala)残基另外^[87]，有研究表明 P1 位点也可能是 E（谷氨酸）^[90]。

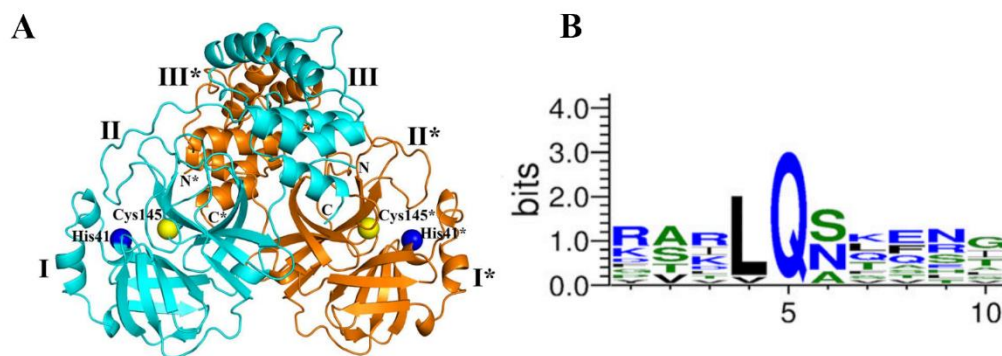


图 1.4 新冠病毒 NSP5 的结果与识别位点^[86-87]

Figure1.4 Cross-conservation of the NSP7 predicted T cell epitope with Tregitope 289^[86-87]

注：A：为新冠病毒 NSP5 的结构，二聚体的一个原聚体用浅蓝色表示，另一个用橙色表示；B：S2 NSP5 的特异性识别序列。

1.2.2 新冠病毒 NSP5 切割宿主蛋白

NSP5 可以切割多种宿主蛋白。例如，NSP5 特异性降解能够识别新冠病毒刺突蛋白的 Galectin-8 抑制病毒自噬^[91]；NSP5 切割 RNF20 阻止由 RNF20 介导的 SREBP1 的降解，并促进 SARS-CoV-2 的复制^[87]；NSP5 切割宿主 MAGED2 蛋白，导致 MAGED2 蛋白的 N 端进入细胞核从而不能发挥抗病毒作用^[108]；NSP5 还可切割 Hippo 信号通路的关键蛋白 YAP1, CREB1, ATF1、MAP4K5 等^[91]。已有研究利用底物靶向的蛋白组学和底物筛选技术揭示了新冠病毒 NSP5 的完整底物图谱，

进一步说明 NSP5 在生理条件下能通过切割宿主蛋白干扰宿主转录、翻译系统促进自身的增殖^[91]。以上都说明 NSP5 通过切割多种宿主蛋白在多点破坏细胞以增强复制和感染同时迅速抑制抗病毒反应。3CL^{pro} 在病毒增殖及致病过程中发挥关键作用，也常作为开发抗病毒药物的重要靶标^[90]。

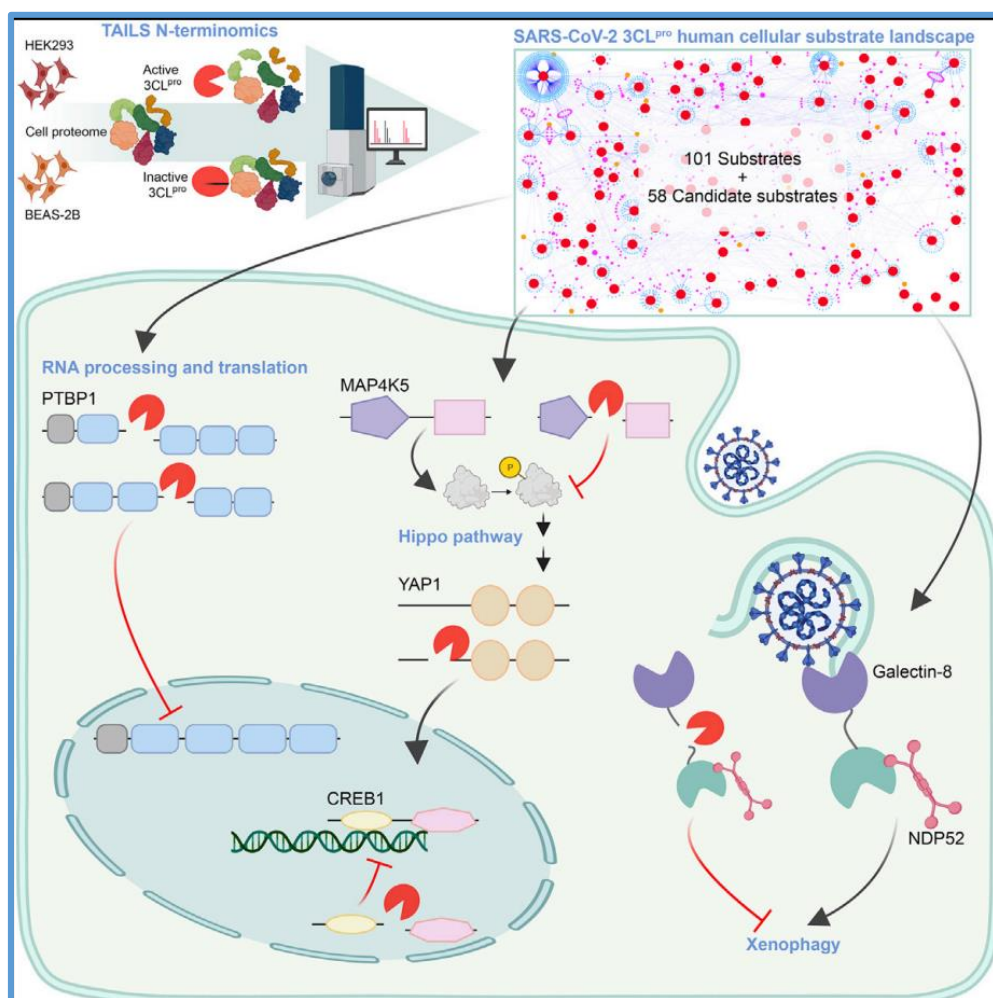


图 1.5 新冠病毒 NSP5 切割多种宿主蛋白^[91]

Figure1.5 SARS-CoV-2 NSP5 cleaves multiple host proteins^[91]

1.2.3 新冠病毒 NSP5 切割病毒自身蛋白

NSP5 可切割新冠病毒多聚蛋白产生非结构蛋白用于组装形成病毒的转录复制复合体^[14]，这些非结构蛋白在拮抗宿主固有免疫尤其是干扰素（IFN）应答中也发挥重要作用^[63]。而 NSP5 切割多聚蛋白释放非结构蛋白是有先后顺序的，NSP5 会根据其与切割位点的亲和力选择切割顺序^[40]。NSP5 会根据其与切割位点的亲和力选择切割顺序，除此之外，还有一个模型与其共同发挥作用，即多聚蛋白驱动模型，

指多聚蛋白的切割位点一部分暴露于蛋白表面，当 NSP5 切割这些位点后，埋藏于多聚蛋白内部的切割位点逐渐暴露，使 NSP5 可以进一步切割^[15]。如图 1.6 (B)，以 NSP5 切割 NSP7-10 为例，NSP5 首先切割 NSP9/10 位点，使多聚蛋白释放出 NSP10，该蛋白与中间体 NSP7-9 同时出现；随着反应的进行，另一种中间体 (NSP7-8)和其他产物(NSP7、NSP8 或 NSP9)被释放出来^[15]。新冠病毒 NSP5 以由大到小方式分段切割多聚蛋白，这为研究提供了一个新思路，NSP5 将多聚蛋白切割成非结构蛋白后是否会进一步切割多聚蛋白的内部，产生病毒蛋白的新形式呢？如图 1.6 (C)，根据 NSP5 的特异性识别序列分析新冠病毒 NSP7 序列，发现 NSP7 上可能存在两个 NSP5 切割位点：Q18 和 Q34。NSP7 是否被进一步切割为 NSP7 功能的研究提供的新视角，切割后的 NSP7 片段可能会有新的功能。

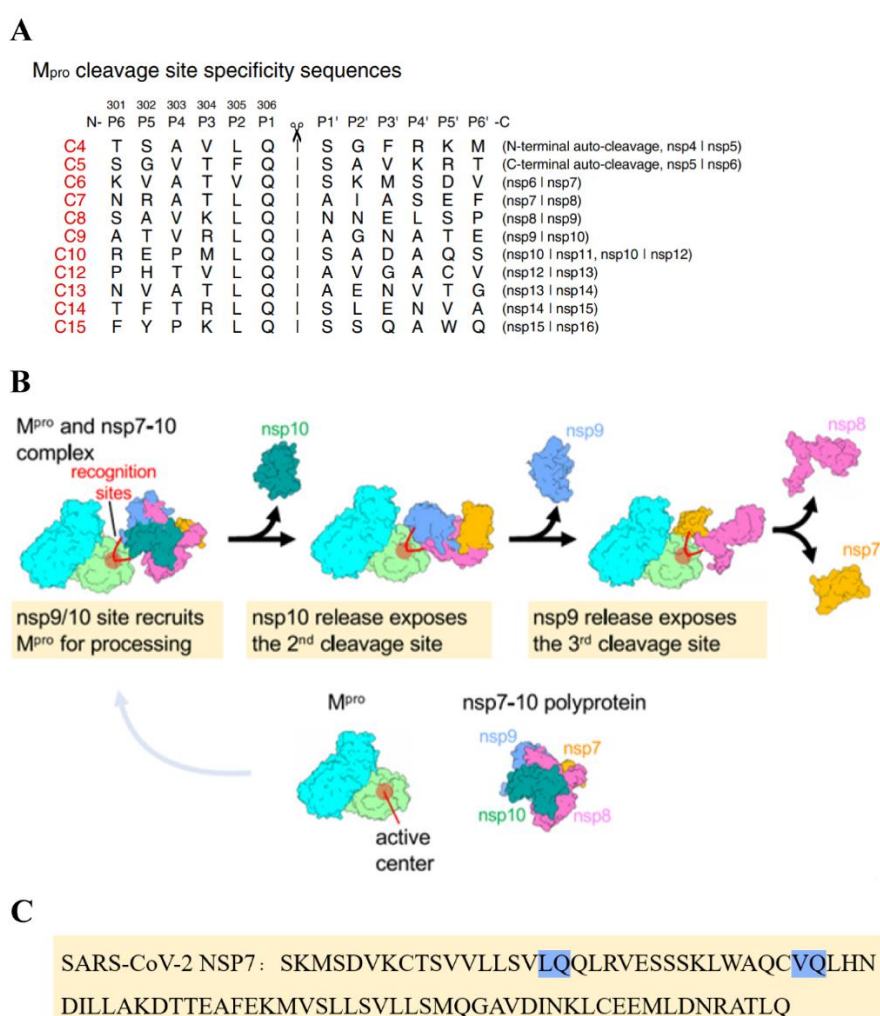


图 1.6 M^{pro} 加工多聚蛋白过程^{[15][40]}

图 1.6 The stepwise of polyprotein processing by M^{pro}^{[15][40]}

注：A： NSP5 的 11 个切割位点附近的残基（P6 - P6'）；B： 多聚蛋白驱动模型；C： 新冠病毒 NSP7 的

NSP5 预测切割位点，蓝色为 Q18 和 Q34 位点。

1.3 新冠病毒 NSP7 的研究进展

1.3.1 新冠病毒 NSP7 的结构

NSP7 的晶体结构显示 NSP7 是一种全 α 螺旋蛋白，由四个螺旋区域组成。NSP7 带 N 端螺旋束：HB1，HB2，HB3，HCT。HB1，HB2，HB3 通过疏水残基互作一个三链反平行螺旋束^[6] ^[64-65]。当 NSP7 与 NSP8 结合时，NSP7 的 N 端和 C 端螺旋区域的位置发生改变。如图 1.7，SARS-CoV-2 和 SARS-CoV 的 NSP7 序列几乎相同，只在第 70 位存在一个氨基酸的差异^[66-67]。

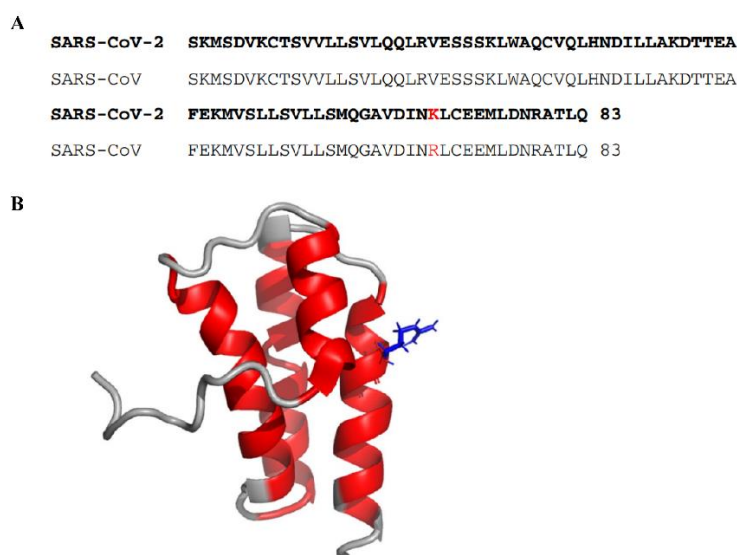


图 1.7 SARS-CoV-2 和 SARS-CoV NSP7 的比较^[67]

Figure1.7 Comparison of nsp7 from SARS-CoV-2 and SARS-CoV^[67]

注：A：SARS-CoV-2 和 SARS-CoV 的 NSP7 序列比较；B：在核磁共振测定的 SARS-CoV nsp7 结构基础上绘制的 SARS-CoV-2 NSP7 结构；

1.3.2 新冠病毒 NSP7 的功能

(1) NSP7 作为转录复制复合物的辅助因子激活 RdRp (RNA-dependent RNA polymerases; NSP12) 的活性。催化病毒 RNA 合成的 NSP12 是复制和转录机制的核心组成部分，但必须有 NSP7-NSP8 复合物的存在才可使 NSP12 激活而具有催化活性^[68-70]。如图 1.8，新冠病毒 NSP12 有两个结构域为“右手”RdRp 结构域和套病毒 (nidovirus) 独特的 N 端延伸结构域。RdRp 结构域可看作一只手，可分为 3 个

子结构域：手指亚结构域，手掌亚结构域和拇指亚结构域^[71-72]。聚合酶结构域和 NiRAN 主结构域通过一个界面结构域连接。NSP7 和 NSP8 结合于拇指结构域上，另一个 NSP8 结合于手指结构域上^[73-76]。NSP12 的外表面为负静电势，然而，聚合酶 RNA 模板和核苷酸三磷酸(NTP)结合位点具有很强的正静电势。NSP7 和两个 NSP8 结合位点以及 RNA 出口通道相对中性，与 NSP12 接触的 NSP7 和 NSP8 表面也是相对中性的^[77]。NSP7 和 NSP8 会为适应 NSP12 结合 RNA 而发生结构重排^[72]，NSP7 作用是参与稳定 NSP12 结合 RNA。

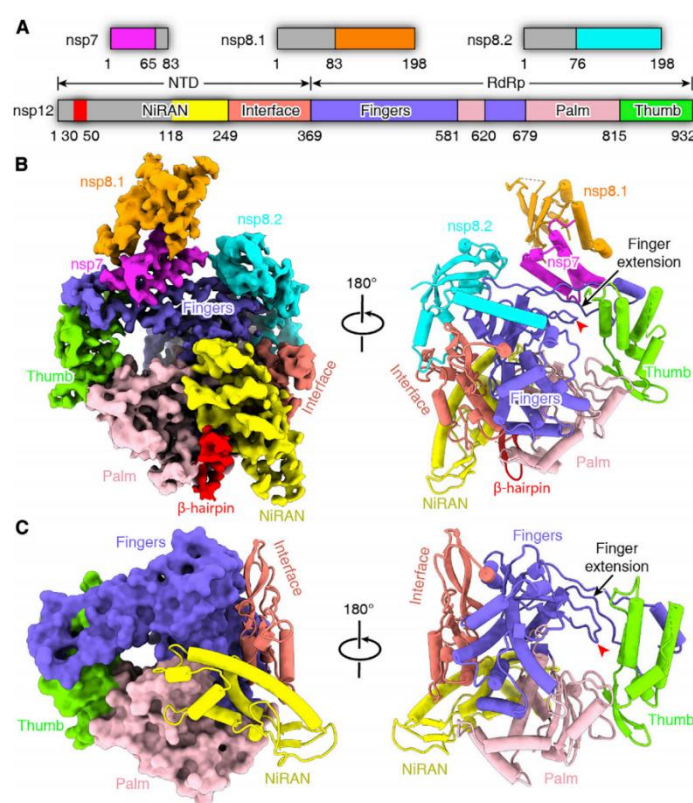


图 1.8 新型冠状病毒核心聚合酶复合物的整体结构^[77]

Figure1.8 Overall Structure of the SARSCoV-2 Core Polymerase Complex^[77]

注：A：聚合酶复合物各亚基结构域结构示意图。每个结构域由唯一的颜色表示。未解析的结构域用灰色表示。B：不同视角下 SARS-CoV-2 NSP12-NSP7-NSP8 核心复合体的总体密度图(左)和原子模型(右)。图中结构模型由与 A 的结构域以相同颜色代表。C：不同视图中 NSP12 聚合酶亚基的结构，用与(A)相同的结构域着色。

(2) 新冠病毒 NSP7 对宿主细胞的作用。SARS-CoV-2 病毒蛋白在人体中参与到广泛的细胞生物学过程，如图，该研究通过亲和纯化质谱技术鉴定了与 SARS-CoV-2 NSP7 蛋白相关的宿主蛋白，其互作蛋白参与的生物学过程包括电子传递、

膜运输、GPCR 信号转导。

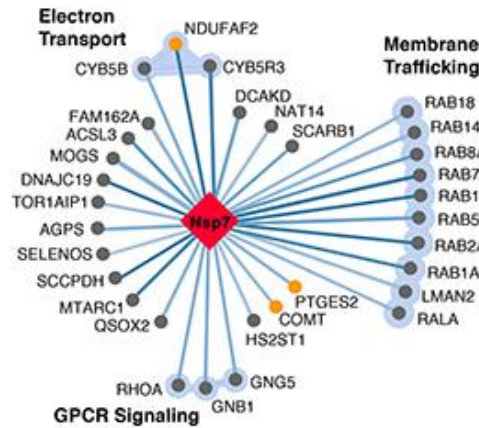


图 1.9 新型冠状病毒 NSP7 蛋白交互网络^[81]

Figure1.9 SARS-CoV-2 NSP7 protein-protein interaction network^[81]

(3) NSP7 抑制 I 型和 III 型 IFN 的产生。在 COVID-19 大流行中，充分激活先天抗病毒反应对于抑制病毒繁殖和影响病毒相关疾病的预后至关重要。众所周知，SARS-CoV-2 进化出多种对抗宿主免疫反应的策略，从而导致病毒在感染早期过度复制，延迟的抗病毒反应最终导致过度活跃的促炎反应，这可能导致细胞因子风暴或高细胞因子血症^[78]。SARS-CoV-2 NSP7 调控先天抗病毒免疫反应的新机制，从而促进了病毒的传播。NSP7 通过破坏 RIG-I/MDA5-MAVS、TLR3-TRIF 和 cGAS-STING 信号通路抑制 I 型和 III 型 IFN 的表达^[81]。

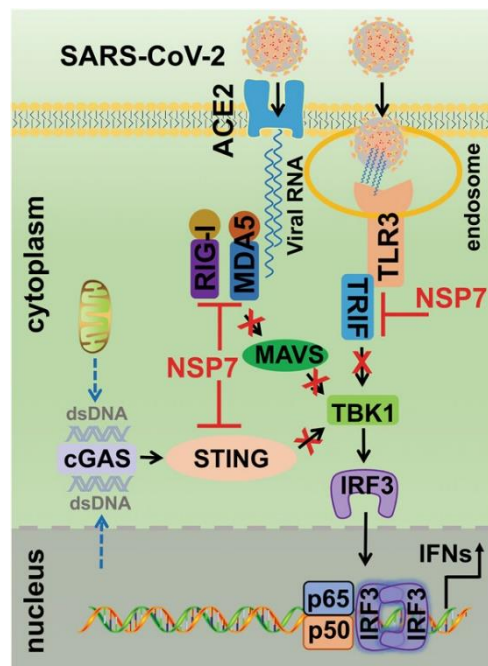


图 1.10 新型冠状病毒 NSP7 抑制干扰素的作用方式^[82]

Figure1.10 The working model of SARS-CoV-2 NSP7 in suppressing IFN responses^[82]

(4) Treg 表位的 SARS-CoV-2 NSP7 同源物抑制 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞记忆反应。病原体通过 T 细胞表位突变或缺失(免疫逃逸)和模拟人类 T 细胞表位的外观(免疫伪装)逃避宿主防御。有研究在 SARS-CoV-2 的非结构蛋白 7 (NSP7)、RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RdRp)异源四聚体复合体中发现了一个高度保守的、类似人的 T 细胞表位。值得注意的是, 该 T 细胞表位与先前在人免疫球蛋白 G (IgG) Fc 区发现的 T 调节细胞表位(Tregitope 289)具有显著的同源性。通过比较 NSP7-289 和 IgG Tregitopes, 发现 tregiope 肽 289、289z 和 NSP7-289 在体外结合多个 HLA-DRB1 等位基因, 抑制 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞记忆反应。SARS-CoV-2 NSP7-289 的鉴定和体外验证表明病原体可以利用类人表位逃避免疫反应, 并可能增强宿主的耐受性。有必要进一步探索交叉保守 Tregs 在人类对 SARS-CoV-2 等病原体的免疫反应中的作用。

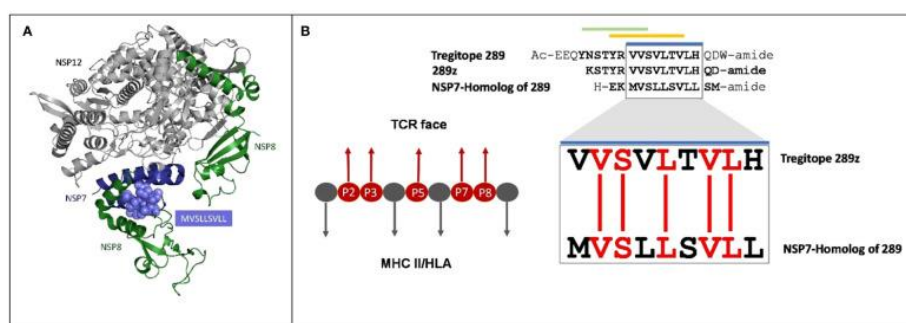
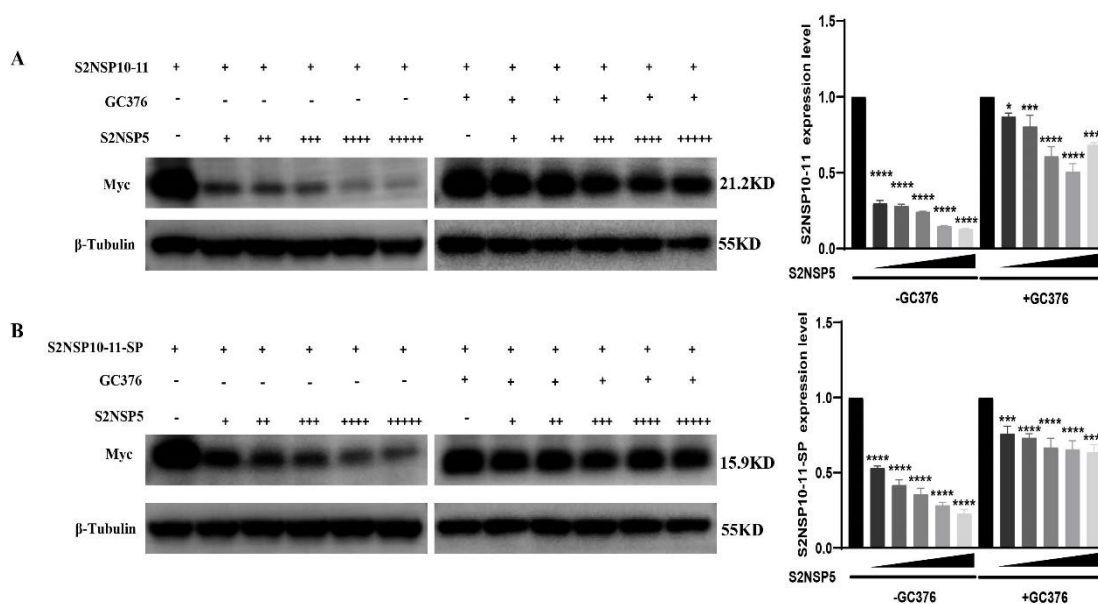


图 1.11 T 细胞表位 Tregitope 289 预测 NSP7 交叉保守区域。^[84]

Figure1.11 Cross-conservation of the NSP7 predicted T cell epitope with Tregitope 289.^[84]

1.4 SARS-CoV-2 的蛋白非经典形式

本课题组前期研究发现新型冠状病毒天然存在 NSP10-11 二聚体^[93], 其与 FAF2 互作通过内质网应激通路 ATF6 诱导内质网应激^[93], 提示新冠病毒蛋白存在新冠病毒蛋白非经典形式, 给病毒功能的研究提供了新视角。

图 1.12 新冠病毒中 NSP10-11 不完全切割^[93]Figure1.12 NSP10-11 incomplete cleavage in SARS-CoV-2^[93]

1.5 选题的目的和意义

本课题证明新冠病毒 NSP5 对 NSP7 有切割作用，并明确切割产物和切割位点；解析 NSP5 切割对 NSP7 亚细胞定位的影响；探究 NSP5 切割对 NSP7 功能的影响。

本课题在 NSP5 对新冠病毒多聚蛋白切割产生 NSP7 基础上进一步对 NSP7 内部切割，创新性发现病毒蛋白非经典形式，加深病毒与宿主互作的认识。

2 新冠病毒 NSP5 对 NSP7 切割的初探

2.1 引言

NSP5 (nonstructural protein 5) 也称为 3C 样蛋白酶, 可水解 ORF1a 和 ORF1ab 编码的两个多聚蛋白 pp1a 和 pp1ab^[92]。SARS-CoV-2 中 NSP5 在病毒复制过程中水解 pp1a 和 pp1ab 产生非结构蛋白 NSP4-NSP16, 在病毒复制与转录中起重要作用^{[13][93]}。已有研究证实冠状病毒 NSP5 His41 残基和 Cys145 残基 NSP5 的酶活性位点^{[86][93]}, 切割 P1 位置特异性识别位点是 Q^[86]。本实验通过使用 NSP5 的抑制剂 GC376 或者构建 NSP5 失活突变体, 验证 NSP5 在切割中发挥的作用。有趣的是, 在 EAV 的非结构蛋白 NSP7 内部存在保守切割位点, 新冠病毒 NSP7 内部是否也存在 NSP5 的酶切位点仍有待研究^[95]。

本章设计 NSP5 与 NSP7 切割实验, 初步证明 NSP5 切割 NSP7; 以 GC376 作为 NSP5 的抑制剂, 检测 NSP5 活性被抑制后对切割的影响。用三种蛋白酶体降解途径的抑制剂排除细胞内蛋白降解途径的干扰。为 NSP7 的蛋白非经典形式提供理论基础。

2.2 材料

2.2.1 细胞、菌株

HEK-293T 由本实验室保存; DH5 α 菌株由本实验室保存。

2.2.2 质粒

s2 nsp7、s2 nsp5 基因信息来自 NCBI (NC_045512.2)。基因优化密码子后由擎科生物科技有限公司合成, 质粒名称分别为: p3.1 s2 nsp7 myc flag 和 p3.1s2 nsp5myc, pcDNA3.1 于擎科生物科技有限公司购买, pEGFPN1 空载由擎科生物科技有限公司赠送。

表 2.1 质粒种类

Tab.2.1 The type of plasmid

类别	质粒名称
	pEGFPN1

续表 2.1 质粒种类

Continued Tab.2.1 The type of plasmid

	pcDNA3.1
SARS-CoV-2	p3.1 s2 nsp5 myc
SARS-CoV-2	P3.1 s2 nsp7 myc flag

2.2.3 试剂

表 2.2 实验试剂

Tab.2.2 Experimental reagents

名称	厂家
TaKaRa Ex Taq [®] DNA Polymerase ; PrimeScript [™] One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Dye Plus)	宝日医生物技术(北京)有限公司
甲醇	天津风船化学试剂科技有限公司
青链霉素混合液, 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 二甲基亚砷 (DMSO), 50×TAE, 脱脂奶粉, 十二烷基硫酸钠 (Sodium dodecyl sulfate, SDS), 30% (w/v) 丙烯酰胺溶液, RIPA 细胞全蛋白裂解液, 过硫酸铵 (Ammonium persulphate, APS), 5×SDS-PAGE 上样缓冲液, 20×PBS, 三(羟甲基)氨基甲烷 (TRIS), 四甲基乙二胺 (TEMED)	北京索莱宝科技有限公司
HindIII, BamHI	江苏愚公生物科技有限公司
酶标板	苏州赛普生物科技有限公司
Tween-20, 酵母提取物, 核酸染料, DNA maker, 卡那青霉素, 甘氨酸, 蛋白胨, DMEM 培养基	上海生工生物工程股份有限公司
山羊抗小鼠/兔 IgG 抗体	Cell Signaling Technology
超敏 ECL 化学发光试剂盒	新赛美生物科技有限公司
蛋白免疫印迹 PVDF 膜	Millipore
Myc 标签抗体	北京博蕾德生物科技有限公司

续表 2.2 实验试剂

Continued Tab.2.2 Experimental reagents

GFP、His、Flag、HA 标签抗体	Cell Signaling Technology
Chymostatin, GC376	MedMol
MG132 、 Bafilomycin-A1 、 Z-VAD-OMe-FMK	MCE
PEI	Ploysciences
琼脂糖	BIOWEST
β -Tubulin 抗体	武汉亚克因生物技术有限公司

2.2.4 试剂配制

表 2.3 试剂配制

Tab.2.3 reagent compounding

名称	配制方法
1 M Tris-HCL (pH6.8)	称取 121.91g 溶于 800mL 超纯水中, 调节 pH 至 6.8 后定容至 1L。
1.5 M Tris-HCL (pH8.8)	称取 181.7g 溶于 800mL 超纯水中, 调节 pH 至 8.8 后定容至 1L。
10%APS (10mL)	称取 2g APS 溶于 18mL 超纯水定容至 20mL, -20 保存。
10%SDS (10mL)	称取 2g SDS 溶于 18mL 超纯水定容至 20mL, 室温保存。
5×蛋白上样缓冲液	吸取 1M Tris-HCL (pH6.8) 1.25mL, 甘油 2.5mL; 称取 SDS 0.5g, 溴酚蓝 0.025g, 用超纯水定容至 5mL, 分装与 1.5mL EP 管中, 500 μ L/份, 保存于-20 冰箱, 用之前加入 25 μ L 巯基还原剂。
1×电泳缓冲液 (1L)	称取 Tris 3g, 甘氨酸 18.8g, SDS 1g 溶于 800mL 超纯水中, 定容至 1L。
1×转膜缓冲液 (1L)	称取 Tris 3.025g, 甘氨酸 14.425g 溶于 700mL 超纯水中, 定容至 800mL, 再加入 200mL 甲醇。
10×TBS	称取氯化钠 40g, 氯化钾 1g, Tris 15g 溶于 400mL 超

续表 2.3 试剂配制

Continued Tab.2.3 reagent compounding

10×TBS	纯水中，调节 pH 至 7.4 后定容至 500mL。
TBST	吸取 50mL 10×TBS 于 450mL 超纯水中，再加入 500μL Tween-20，混匀。
5%脱脂牛奶（40mL）	称取 2g 脱脂奶粉溶于 40mL TBST 溶液中。
1×TAE（1L）	取 20mL 50×TAE 加入 980mL 超纯水混匀。

2.2.5 实验仪器

本实验用到的仪器主要有：纯水仪（美国 ELGA），高压灭菌锅（ZEALWAY），PCR 仪（ABI），蛋白印迹显像系统（GE Healthcare），涡旋混匀仪（VORTEX-GENIE），酶标仪（Bio-Tek），离心机（GENESPEED），蛋白转印槽（BIO-RAD），-80 超低温冰箱（海尔），-20 低温冰箱（中都美菱），4℃冰箱（中都美菱），恒温摇床（百晶生物），凝胶成像仪（Gene），电泳仪（BIO-RAD），恒温摇床（SCIOLOGEX），恒温水浴锅（上海一恒），伯乐 CFX96 荧光定量 PCR 仪（Biorad）。

2.3 方法

2.3.1 质粒转化

- （1）注意全程在冰上操作，先将 5μL 质粒加入 50μL 感受态细胞后轻弹混匀，静置 30min；
- （2）42℃热激 60s，冰浴 5min 后加入 500μL LB 液体培养基，37℃，220rpm，摇菌 65min；
- （3）涂板：37℃过夜培养后 4℃保存备用；

2.3.2 无缝克隆构建载体

无缝克隆是通过在目的片段的两端通过引物设计扩增出约 15-20bp 与线性化表达载体末端相同的序列，这样片段与载体两端序列同源重合，同源重组酶能识别这种同源序列并完成融合。通过该方法可以将多种片段同时连接在载体上，并应用于多种载体构建方式、比如点突变载体。与传统酶切不同，无缝克隆可以将目的片段没有空隙的连接起来，引物不需要设有酶切位点，且实验效率大大提高。

如图，是无缝克隆的原理。

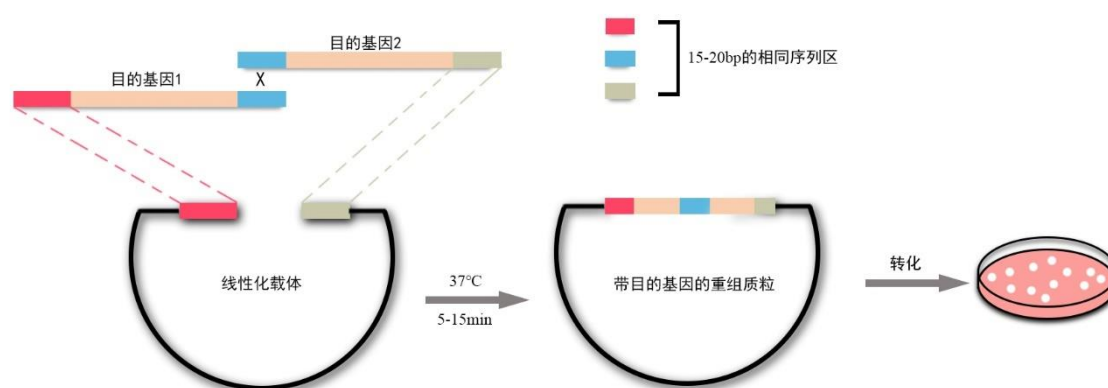


图 2.1 无缝克隆原理图

Figure2.1 Seamless cloning of schematics

本节所构建的载体分别为 p3.1 s2 nsp7 GFP、p3.1 s2 nsp5 HA、p3.1 s2 nsp5 HA C145A 表 2.5 为构建上述质粒设计的引物。

表 2.4 引物信息

Tab.2.4 Primer information

名称	序列 (5'-3')
EGFP-F	GTTTAAACTTAAGCTGCCACCATGGTGAGCAAGGG
EGFP-R	GTCGCTCATTTTGCTCTTGTACAGCTCGTCCATGC
S2 NSP7-F	GACGAGCTGTACAAGAGCAAAATGAGCGACGTGAA
S2 NSP7-R	CTGGACTAGTGGATCTCATGCCAGGGTGGCCCGGTTGTCCA
S2 NSP5 HA-F	GTTTAAACTTAAGCTTATGAGCGGGTTCCGGAAGAT
S2 NSP5 HA-R	CTGGACTAGTGGATCCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG GGTATTGAAAGGTCACCTCCAGAAC
S2 NSP5-C145A-1F	GTTTAAACTTAAGCTTATGAGCGGGTTCCGGAAGAT
S2 NSP5-C145A-1R	ATGTTGAAGCCCACGCTTCCTGCGGAGCCGTTGAGGAAGCTGC
S2 NSP5-C145A-2F	TTCCTCAACGGCTCCGCAGGAAGCGTGGGCTTCAACAT
S2 NSP5-C145A-2R	CTGGACTAGTGGATCCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG GGTATTGAAAGGTCACCTCCAGAAC

以 p3.1 s2 nsp7 GFP 的构建为例介绍无缝克隆的步骤：

(1) 以 p3.1 s2 nsp7 myc flag、pEGFP-N1 序列信息，设计引物将 *gfp* 和 *nsp7* 以同源重组的方式连接，引物包括 15-20bp 碱基互补配对序列和 15-25bp 同源臂序列；

(2) PCR 扩增 *s2 nsp7*、*gfp* 基因；

表 2.5 反应体系

Tab.2.5 reaction system

组分	体积
ddH ₂ O	To 50μL
TaKaRa E× Taq	0.25μL
10×Ex Taq Buffer	5μL
dNTP Mixture	4μL
Primer1 (5μM)	2μL
Primer2 (5μM)	2μL
Template (质粒 DNA)	20ng
ddH ₂ O	up to 50μL

表 2.6 反应程序

Tab.2.6 reaction procedure

温度	时间	循环数
94°C	5min	1
98°C	10s	30
55°C	30s	30
72°C	60s/kb	30
72°C	10min	1

(3) 用 DNA 产物纯化试剂盒 (TIANGEN) 纯化 PCR 产物；

(4) 双酶切 pcDNA3.1 质粒，制备 pcDNA3.1，pEGFP-N1 线性化载体；

表 2.7 反应体系

Tab2.7 reaction system

组分	体积
ddH ₂ O	To 20μL
10×CutOne™ Buffer	2μL
LightNing™ HindIII	1μL

续表 2.7 反应体系

Continued Tab.2.7 reaction system

LightNing™ BamHI	1μL
pcDNA3.1 或 pEGFP-N1	1μg

37℃孵育 30min，跑胶后观察条带大小，大小正确后用胶回收试剂盒回收；

(4) 同源重组

表 2.8 连接体系

Tab.2.8 ligation system

组分	体积
重组酶	5μL
线性化载体	200ng
插入片段	10-40ng
ddH ₂ O	To 10μL

混匀后，放置于金属浴 55℃，重组 15min。

(5) 取 10μL 进行大肠杆菌转化，方法同 2.3.1。

轻弹大肠杆菌，加入质粒轻弹混匀，置于冰上 30min，水浴锅 42℃热击 90s，冰浴 2min；在超净中加入 500μL 的 LB 培养基，置于摇床（220rpm 37℃）中 65min 后涂板。

(6) 菌液 PCR：挑取 8 个单菌落培养 12h，菌液 PCR 方法同（2），核酸电泳后将位置正确的样品送测。

2.3.3 HEK-293T 细胞转染

以 6 孔板为例，转染按照 PEI 转染说明书进行。将 120 万细胞接种于 6 孔板/孔，37℃、5%二氧化碳的培养箱中过夜培养至细胞汇合度为 70-85%；质粒 DNA 与 PEI 的比例以 1μg: 3μl 分别加入含有 100μL DMEM 的 1.5mL RNA-freeEP 管中，振荡瞬离后静置 5min，将 PEI 加入质粒管中振荡瞬离后静置 20min。混合液均匀地滴加在孔内培养，6-8h 后换液继续培养 30-48h 后进行下一步实验。

2.3.4 蛋白提取

(1) PBS 洗两次，第三次用 PBS 将细胞吹下放入 1.5mL EP 管中；

- (2) 4°C, 4000rpm 离心 10min, 吸干净上清;
- (3) 向细胞沉淀中加入 120 μ L RIPA 裂解液, 再加入 PMSF, 每隔 5min 振荡混匀, 裂解 30min;
- (4) 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清为蛋白样品;
- (5) 使用莫纳生物科技有限公司的 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量, 煮样;

2.3.5 免疫印记

- (1) 制胶: 按照表 2.10 和表 2.11 配制分离胶和浓缩胶, 凝固时间为 30min;

表 2.9 SDS-PAGE 分离胶配方

Tab.2.9 SDS-PAGE separated Gel formula

组分	(12%Gel) 体积 (mL)	(15%Gel) 体积 (mL)
ddH ₂ O	4.9	3.4
30% Acrylamide	6.0	7.5
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	3.8	3.8
10% SDS	0.15	0.15
10% APS	0.15	0.15
TEMED	0.006	0.006

表 2.10 SDS-PAGE 浓缩胶配方

Tab.2.10 SDS-PAGE concentrated Gel formula

组分	体积 (mL)
ddH ₂ O	4.1
30% Acrylamide	1.0
1.0 M Tris-HCl (pH6.8)	0.75
10% SDS	0.06
10% APS	0.06
TEMED	0.006

- (2) 电泳: 上样后对准电极, 70V 跑浓缩胶, 120V 跑分离胶;
- (3) 转膜: 按照图 2.2 中胶和 PVDF 膜顺序安装好, 在冰水混合物中 110V 转膜 70min;
- (4) 抗体孵育: 一抗 4°C过夜孵育后 TBST 洗三次, 二抗孵育室温孵育 1h;
- (5) 曝膜;

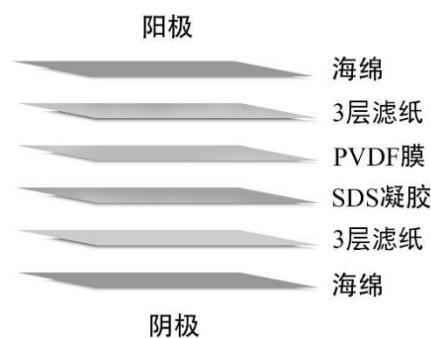


图 2.2 转膜中胶和 PVDF 膜放置顺序

Figure2.2 The Placement order of Gel and PVDF in transfer

2.3.6 HEK-293T RNA 提取

以 6 孔板为例：

注意全程冰上操作，首先将培养好的细胞用 PBS 洗 2 次后每孔加入 1mL Trizol，吹吸后静置 5min；加入氯仿 200 μ L/孔，涡旋 15s，静置 5min；离心后溶液分层，上层、中层和下层分别是 RNA（透明）、Pr（白色）和 DNA（粉色），将上层透明溶液吸入 1.5mL RNA-free EP 管中，注意不要吸到蛋白；加入等体积异丙醇，混匀后静置 5min 离心去上清；加入 500 μ L 75%无水乙醇离心 10min 去上清；开盖使酒精挥发，加入 30 μ L DEPC 混匀后测浓度。

2.3.7 反转录

取上一步提好的 RNA 进行反转录生成 cDNA 用于后续实验，反转录按照 TaKaRa 反转录试剂盒进行。

表 2.11 RT-PCT 反应液

Tab.2.11 RT-PCT reaction solution

试剂	使用量
PrimeScript 1 Step Enzyme Mix	2 μ L
2 $\times$ 1 Step Buffer (Dye Plus)	25 μ L
Primer 1 (10 μ M)	2 μ L
Primer 2 (10 μ M)	2 μ L
Template RNA	$\leq 1\mu$ g
RNase Free dH ₂ O	up to 50 μ L

表 2.12 RT-PCR 反应程序

Tab2.12 RT-PCR reaction procedure

温度	时间	循环
50°C	30 min	
94°C	2 min.	
94°C	30 sec	
55~65°C	30 sec	25~30 cycles
72°C	1 min./kb	

注意：全程冰上操作；戴口罩、少交流、使用 RNA-free EP 管和枪头。

2.3.8 实时荧光定量 PCR

(1) 使用 Beacon Designer 8 设计 qPCR 引物；*Becline 1*、*LC3*、*Atg9A* 和 *Atg16L1* 的 mRNA 信息来自 NCBI，登录号分别为 NM_001313998.2，NM_032514.4，NM_001077198.3，NM_030803.7。表 2.14 为所用 qPCR 引物信息：

表 2.13 qpcr 引物信息

Tab2.13 qpcr primer information

名称	序列 (5'-3')
Becline-qF	GCTGCCGTTATACTGTTC
Becline-qR	CTCCTGTGTCTTCAATCTTG
LC3-qF	CTTCTTCCTGCTGGTGAA
LC3-qR	TTCTCCTGCTCGTAGATG
Atg9A-qF	TGCTTCTTGTCACCTCTT
Atg9A-qR	CCAACACATCTTCGTCATAA
Atg16L1-qF	ACAGGCACGAGATAAGTC
Atg16L1-qR	TTGGTTATTCAGGTCAATCAC

(2) 配制体系：按照 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行。除模板外，加入体系的其他成分。每孔的量按照表 2.14 中的量计算，按照所需孔数配制体系的用量，因配制过程中会出现损耗，可多加 4 个孔；

表 2.14 qPCR 反应液

Tab2.14 qPCR reaction solution

试剂	使用量
2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix	10μL
Primer 1 (10 μM)	0.4μL
Primer 2 (10 μM)	0.4μL
cDNA	2μL
RNase Free dH2O	up to 50 μL

(3) 体系配好后，蓝枪头吹吸 20-30 次混匀，尽量不吹出泡沫，每孔中加 18uL，注意需全部打出白枪头中不要有残留；

(4) 为防止各孔之间的污染，按照下图的路径加入 cDNA 后封膜；

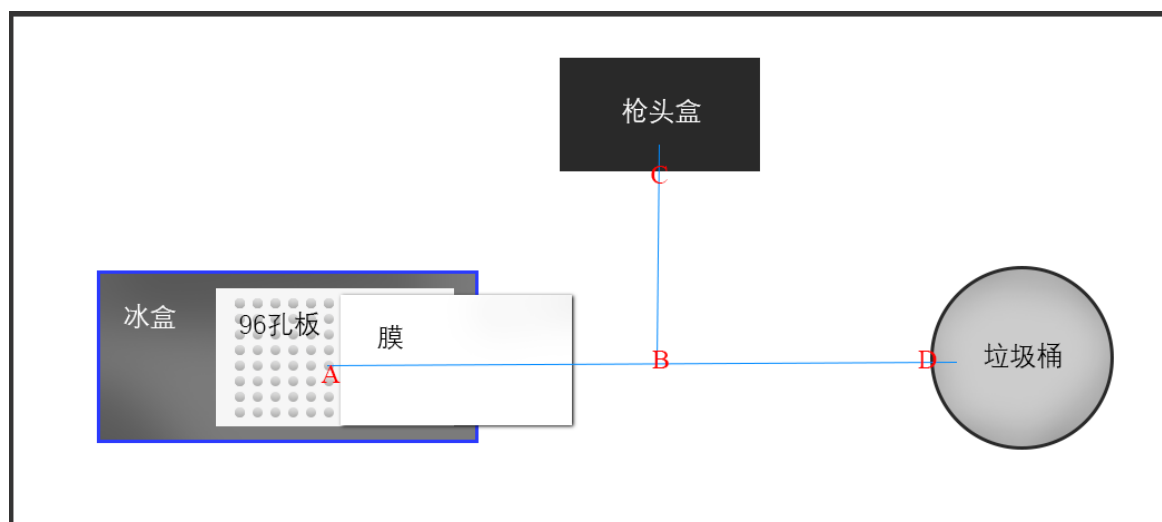


图 2.3 qPCR 加样路径图

Figure2.3 qPCR sampling pathway diagram

注：加样时按照 A-B-C-B-D 的顺序进行；枪头盒手臂不要经过路径以外的上方；

(5) 将 (4) 的 96 孔板置于离心机中离心，4°C，4000rpm，10min，使用 qPCR 仪器按表 2.15 的反应程序反应。

表 2.15 qPCR 反应程序

Tab.2.15 qPCR reaction procedure

Stage	程序	Reps	温度	时间
Stage 1	预变性	1	95°C	30 ses
Stage 2	循环反应	40	95°C	3-10 ses
			60°C	10-30 ses

续表 2.15 qPCR 反应程序

Continued Tab.2.15 qPCR reaction procedure

Stage 3	融解曲线	Reps: 1	95°C	15 ses
			60°C	60 ses
			95°C	15 ses

(6) 保存数据使用 GraphPad Prism 9 进行数据分析;

2.4 实验结果

2.4.1 质粒构建

如图 2.4 (A) 和 (B) 是构建 p3.1 s2 nsp7 GFP、p3.1 s2 nsp5 HA C145A 转化后挑取 8 个单克隆的菌液 PCR 结果，筛选条带正确的克隆后送测，测序结果均正确。

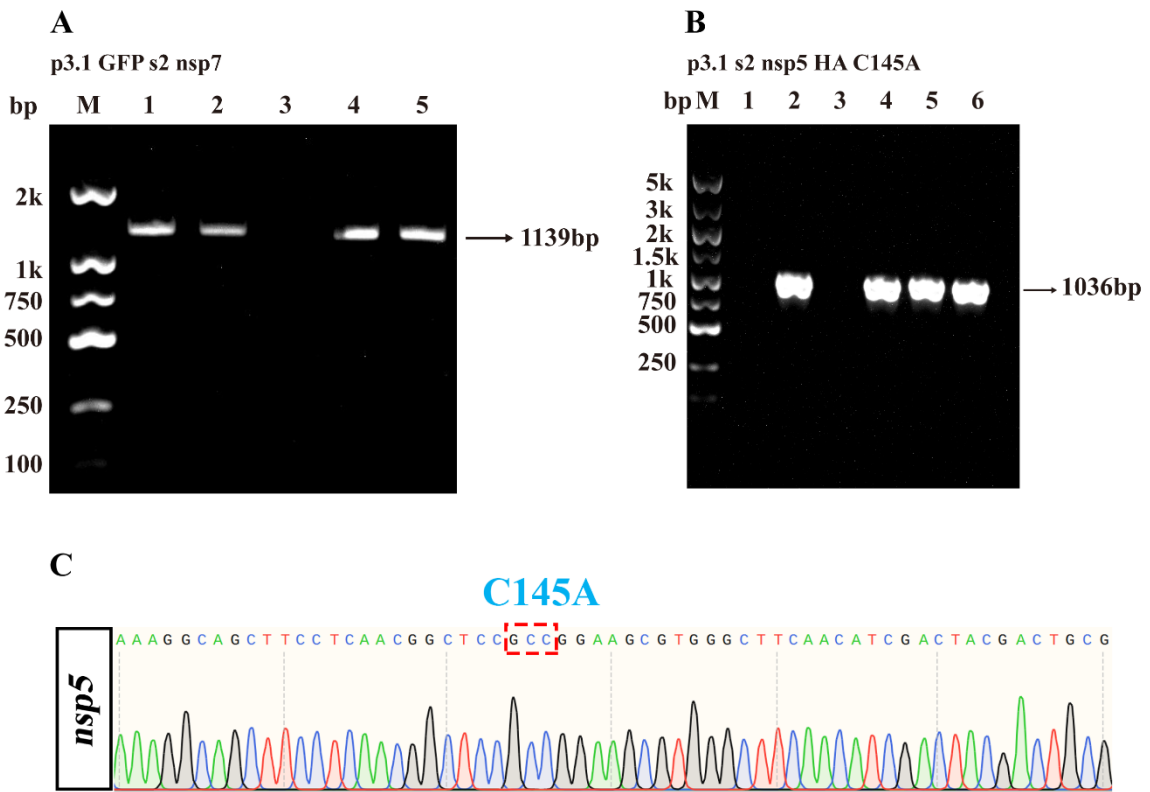


图 2.4 新冠病毒 NSP7 与 NSP5 突变体质粒构建

Figure2.4 Construction of SARS-CoV-2 NSP7 and NSP5 mutant

注： A： NSP7 GFP 载体构建菌液 PCR 结果； B： NSP5 突变体载体构建菌液 PCR 结果； C： NSP5 突变体

载体构建测序结果：

2.4.2 S2 NSP7 的预测切割位点与致病性

NSP5 特异性识别序列的两个关键性位点分别为 P1 (Gln) 和 P2(Leu、Pro 或 Val)，如图 2.5 所示，根据 NSP5 的特异性识别序列推测 NSP7 可能存在两个切割位点 Q18 和 Q34。



图 2.5 NSP5 在 NSP7 的预测切割位点

Figure2.5 Predictive cleavage sites of NSP5 in NSP7

如表 2.16 所示，根据 NSP7 的 2 个预测切割位点对 7 种不同致病性冠状病毒 NSP7 序列，发现 SARS-CoV、SARS-CoV-2 含有这两个切割位点，另外四种致病性比较弱的冠状病毒并没有同时存在 Q18 和 Q34 这两个 NSP5 的 P1 酶切位点。因此除 MERS 外，NSP7 同时存在两个酶切位点可能与冠状病毒的强致病性相关。

表 2.16 NSP5 在 NSP7 的预测切割位点与致病性的相关性

Tab2.16 The correlation between predicted cleavage sites of NSP5 in NSP7 and pathogenicity

酶切位点	3 种高度致病性的冠状病毒			4 种导致温和上呼吸道疾病的冠状病毒			
	SARS-CoV-2	SARS-CoV	MERS-CoV	HCoV-229E	HCoV-NL63	HCoV-OC43	HCoV-HKU1
Q18	+	+	+	-	-	+	+
Q34	+	+	-	-	-	-	-

2.4.3 SARS-CoV-2 中 NSP7 的切割

本研究在初步发现新冠病毒 NSP7 同时存在两个酶切位点可能与冠状病毒的强致病性相关的基础上，探究 NSP7 是否被 NSP5 切割，且 NSP7 上的 Q18 和 Q34 是

否为 NSP5 的切割位点。GC376 是冠状病毒主蛋白酶（NSP5）抑制剂，GC376 处理后将使抑制 NSP5 的活性。由于 NSP7 为小分子蛋白，其切割产物较难检测，因此在 NSP7 的 N 端带上 GFP 标签以便切割条带的检测。本实验转染时 NSP7 量不变，NSP5 量逐渐增加，设计对照组和 GC376 处理组。通过 Western blot 检测 NSP7 主带量的变化情况。若 NSP5 对 NSP7 进行切割，则 NSP7 主带的量将随着 NSP5 量的增加而逐渐减少。结果如图 2.6（A）示意图所示，NSP7 上的 NSP5 预测切割位点为 Q18、Q34，NSP7 产生的切割条带大小分别为 30.05kd 和 31.09kd；如图 2.6（B）所示，NSP5 切割 NSP7 时，随着 NSP5 量逐渐增加，NSP7 量逐渐减少，且在 30.05kd 处出现切割条带，此为 NSP5 作用于切割位点 Q18 可能产生的切割条带；但不加 NSP5 时也存在该条带，可能是由于细胞内的宿主蛋白酶的作用，后续将通过无细胞酶切的方式来排除细胞内宿主酶的影响。GC376 处理后，NSP5 对 NSP7 切割不呈现递减趋势，说明 NSP7 主带的递减趋势可能有 NSP5 的参与；GC376 处理后在 30.05kd 处依旧存在条带，这也可能是细胞内宿主酶的作用。此实验中 NSP7 主带的量递减趋势不明显，这可能是由于 GFP 遮盖 NSP5 在 NSP7 的识别位点，后续实验将去除 GFP 研究。综上所述，初步证实新冠病毒 NSP5 可能切割 NSP7，切割位点可能是 Q18。

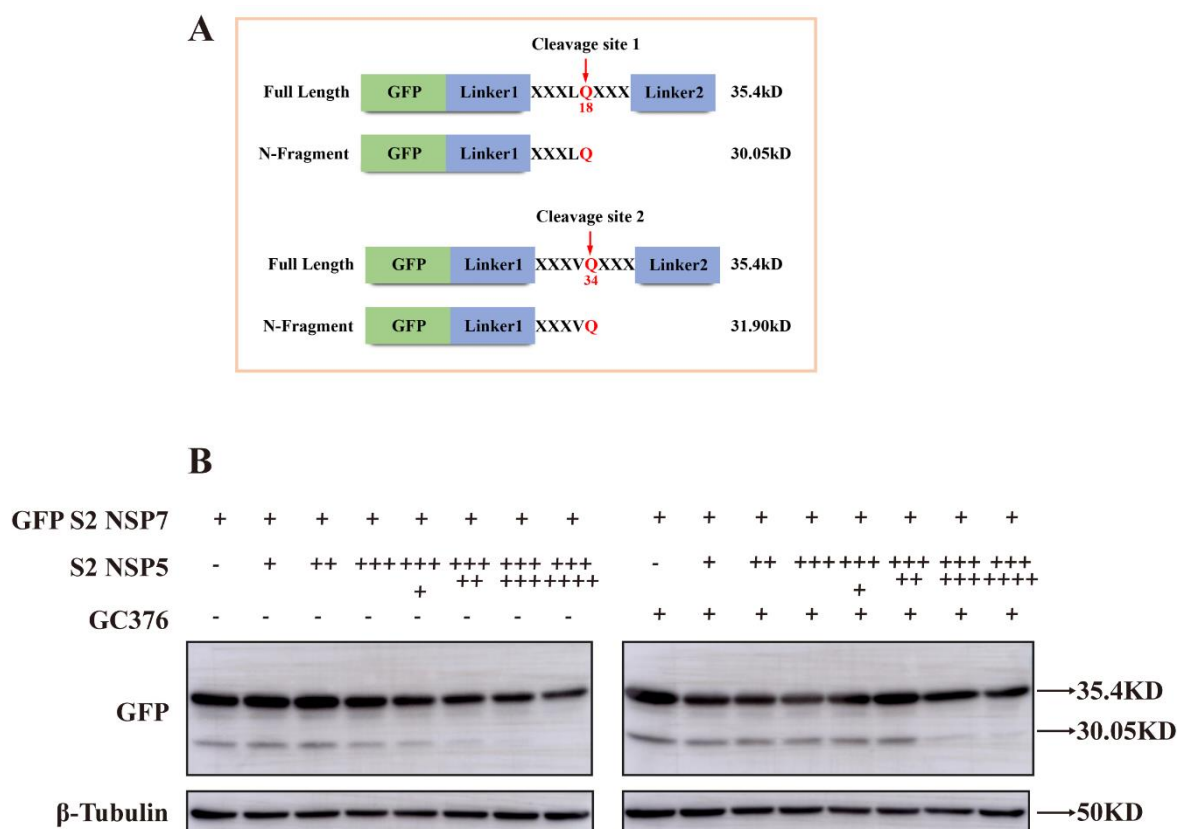


图 2.6 新冠病毒中 NSP5 对 NSP7 的切割

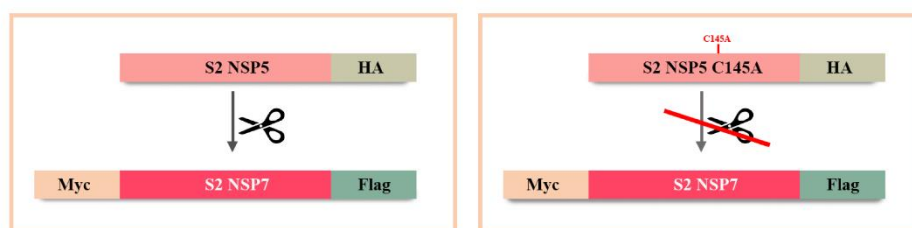
Figure2.6 NSP7 cleavage in SARS-CoV-2

注：A：新冠病毒 NSP5 在预测切割位点 Q18 和 Q34 切割 NSP7 示意图；B：NSP5 切割 N 端带 GFP 标签的 NSP7 以及使用 GC376（50μM）处理 12h。

2.4.4 S2 NSP5 失活突变验证切割

上述实验中并未检测 NSP5，在细胞水平中实验结果往往由多种影响因素导致，为验证 NSP7 的递减趋势是否为 NSP5 的作用，构建 C 端带有 HA 的 NSP5 质粒载体以及 NSP5 C145A 突变体来研究 NSP7 的递减趋势是否有 NSP5 的作用。NSP5 的活性位点为 C145，因此将该位点突变后 NSP5 将会失活。我们按照 NSP7 量不变，NSP5 和 NSP5C145A 的量逐渐增加。通过 Western blot 检测 NSP7 主带的变化趋势，以 β -Tubulin 作为内参。如图 2.7 所示，随着 NSP5 量逐渐增加，Myc 和 Flag 抗体都可检测到 NSP7 主带的量逐渐递减；当 NSP5 失活后，NSP7 的量随着 NSP5 量的增加不呈现递减趋势。综上所述，NSP7 量的递减趋势有 NSP5 的作用。

A



B

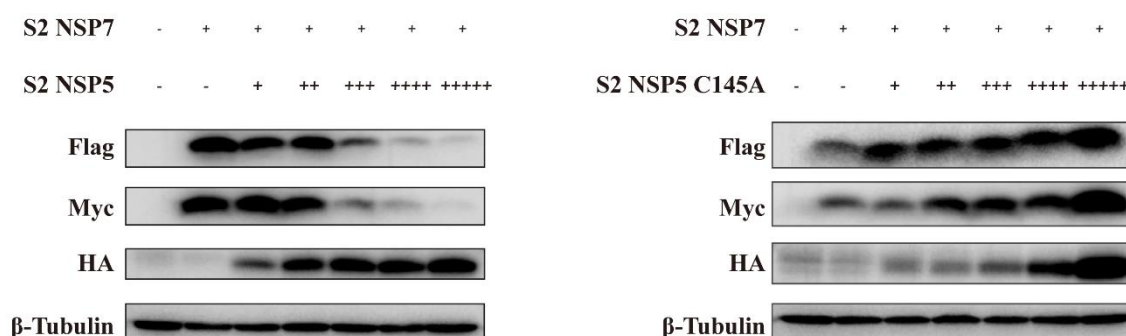


图 2.7 S2 NSP5 失活突变验证切割

Figure2.7 S2 NSP5 inactivation mutation verification cleavage

2.4.5 细胞内蛋白降解途径对 S2 NSP5 切割 S2 NSP7 的影响

细胞中主要有三种蛋白质降解途径分别是泛素-蛋白酶体降解途径，胱天蛋白

酶(caspase)途径和溶酶体途径^[97-98]。为排除 NSP7 的主带减少是否有蛋白降解途径参与，选择这三种蛋白质降解途径的抑制剂进行研究。

本实验使用 MG132 作为蛋白酶体降解途径的抑制剂^[99]，其可阻断 26S 蛋白酶体复合物的蛋白水解活性；使用 Z-VAD(OMe)-FMK 作为胱天蛋白酶(caspase)途径蛋白降解的抑制剂，其可抑制 pan-caspase^[100]。使用 Bafilomycin-A1 作为自噬-溶酶体途径的抑制剂，其是一种自噬 (autophagy) 晚期阶段抑制剂^[101]。本实验中 NSP7 与 NSP5 以 0, 3:1 到 1:3 的比例转染至 293t 细胞，转染换液时加入抑制剂处理 48h。如图 2.8, Western blot 检测结果显示，在 MG132 和 Z-VAD(OMe)-FMK 分别处理下，NSP7 的主带随 NSP5 量的增加逐渐递减，说明泛素-蛋白酶体降解途径和 caspase 途径并不参与 NSP5 对 NSP7 的切割。而在 Bafilomycin-A1 处理下，NSP7 的主带随 NSP5 量的增加不呈现递减趋势，说明自噬-溶酶体途径可能参与 NSP5 对 NSP7 的切割。

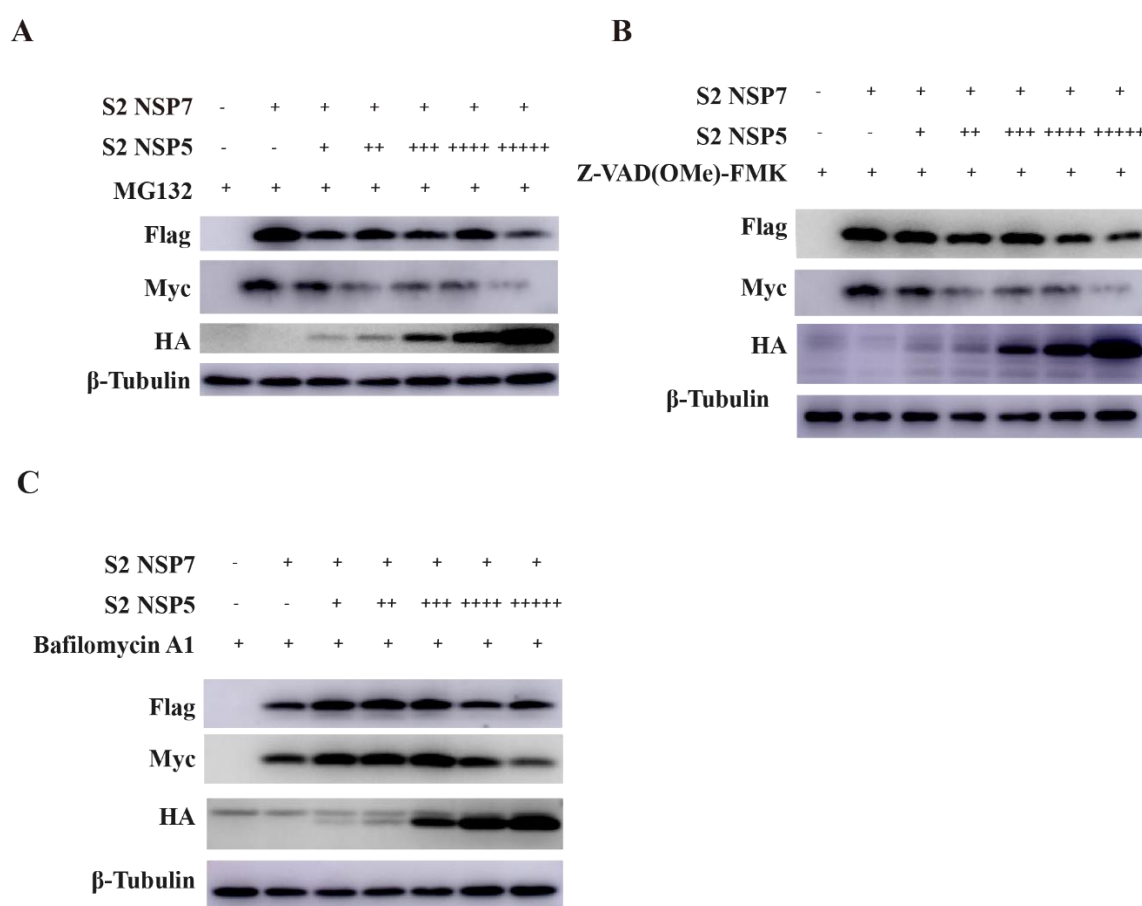


图 2.8 蛋白降解途径对切割的影响

Figure2.8 Effect of protein degradation pathways on cleavage

A: NSP5 切割 NSP7; B: MG132 (7.5 μM) 处理; C: Z-VAD (OMe) -FMK (50 μM) 处理; D:

Bafilomycin A1 (12.5 nM) 处理。

基于上述自噬-溶酶体途径影响 NSP5 对 NSP7 的切割, 选用了 4 个自噬相关基因研究在切割的过程中自噬相关基因是否会因切割而表达升高。分别是 *Beclin 1*、*LC3*、*Atg9* 和 *Atg16L1*, 如图 2.9, 结果显示 *Atg8* 基因表达上升, 验证切割引起了自噬相关基因 *LC3* 的表达上升, 推测切割可能促进自噬体的形成。

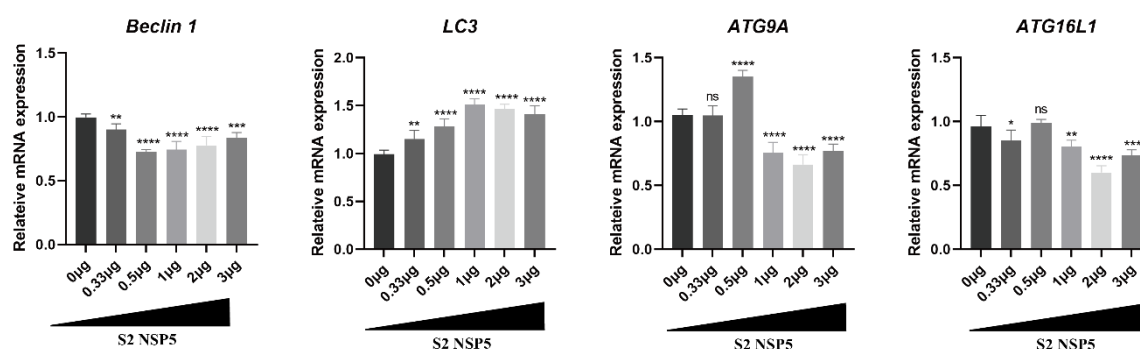


图 2.9 新冠病毒 NSP5 切割 NSP7 时自噬相关因子 mRNA 水平

Figure 2.9 The mRNA level of autophagy related factor when SARS-CoV-2 NSP5 cleaves NSP7

注: 采用单因素方差进行分析, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$ 。

2.5 讨论与小结

本章基于 NSP5 的特异性识别序列推测 NSP7 可能存在两个切割位点 Q18 和 Q34。在感染人的 7 种不同致病性冠状病毒中对假设的两个切割位点进行比对, 发现除 MERS 外, NSP7 同时存在两个酶切位点可能与冠状病毒的强致病性相关。

在初步发现新冠病毒 NSP7 同时存在两个酶切位点可能与冠状病毒的强致病性相关的基础上, 探究 NSP7 是否被 NSP5 切割, 且 Q18 和 Q34 是否为 NSP5 的切割位点。由于 NSP7 的相对分子质量较小, 因此构建带 GFP 标签的 NSP7 载体, Western blot 检测到预测切割条带, 但不加 NSP5 时也存在该条带, 可能是由于细胞内的宿主蛋白酶的作用。当用 GC376 处理后, NSP5 对 NSP7 切割不呈现递减趋势, 说明 NSP7 主带的递减趋势可能有 NSP5 的参与, 但切割位点的确定还需排除一些影响因素。

上述实验中并未检测 NSP5, 在细胞水平中实验结果往往由多种影响因素导致, 为验证 NSP7 的递减趋势是否为 NSP5 的作用, 因此构建 C 端带有 HA 的 NSP5 质粒载体以及 NSP5 C145A 突变体来研究 NSP7 的递减趋势是否有 NSP5 的作用。突

变 NSP5 后 NSP7 主带的量不呈现递减趋势。综上所述，NSP7 量的递减趋势有 NSP5 的作用。将 NSP7 的 E 位点和 Q 位点全部突变后主带也不呈现递减趋势，提示 NSP5 不对 NSP7 (EQmu) 进行切割，进一步说明 NSP5 的 NSP7 切割位点为 Q 或 E。

为排除 NSP7 的主带减少是否有蛋白降解途径参与，使用蛋白酶体抑制剂 (MG132)、caspase 抑制剂 (Z-VAD(OMe)-FMK) 和自噬抑制剂 (Bafilomycin-A1)。结果表明自噬-溶酶体途径可能参与 NSP5 对 NSP7 的切割。

综上，我们的研究首次发现 SARS-CoV-2 NSP5 切割 NSP7，这为 NSP7 的功能研究提供了新思路。

3 新型冠状病毒 NSP5 切割 NSP7 的酶切位点及切割产物

3.1 引言

上一章结果表明新冠病毒 NSP5 切割 NSP7，但 NSP5 在 NSP7 上的切割位点仍不明确，NSP5 在多个酶切位点将 NSP7 切割可能会产生多个切割产物。而细胞内过表达产生的 NSP7 大小为 11.55kD，因此切割产物是小分子蛋白，普通胶无法检测小分子蛋白，选择尿素胶检测小分子蛋白。由于细胞内可能存在宿主酶等复杂因素的影响，且形成的切割产物量少，对检测造成了一定的困难，因此选择原核表达获得纯蛋白用于酶切反应排除细胞内的复杂影响因素。本实验通过构建 NSP7 预测切割位点突变体以及原核表达纯化获得 NSP7 与 NSP5 纯蛋白进行无细胞酶切反应，分析切割位点和切割产物，加深 NSP5 作用于 NSP7 分子机制的认识。

3.2 材料

3.2.1 细胞、菌株

HEK-293T 由本实验室保存；DH5 α 、BL21 菌株由本实验室保存。

3.2.2 质粒

s2 *nsp7*、s2 *nsp5* 基因信息来自 NCBI (NC_045512.2)。基因优化密码子后由擎科生物科技有限公司合成，质粒名称分别为：p3.1 s2 *nsp7* myc flag、p3.1 s2 *nsp5* myc、p3.1 s2 *nsp7* EQmu myc flag。

3.2.3 试剂

表 3.1 实验试剂

Tab3.1 Experimental reagents

名称	厂家
YEAST EXTRACT	OXOID
Sodium chloride, Bis-acrylami, DTT, N,N'-亚甲基双丙烯酰胺	BBI

续表 3.1 实验试剂

Continued Tab.3.1 Experimental reagents	
名称	厂家
Tryptone	Sangon Biotech
尿素, 咪唑, EDTA	Solarbio
Ni 层析介质 (NTA) Ni NTA Beads	北京博奥龙免疫技术有限公司
丙烯酰胺	KESHI
戊二醛	MACKLIN

3.2.4 实验仪器

本实验用到的仪器主要有：高压灭菌锅（ZEALWAY），PCR 仪（ABI），离心机（GENESPEED），蛋白转印槽（BIO-RAD），恒温摇床（百晶生物），凝胶成像仪（Gene），电泳仪（BIO-RAD），恒温摇床（SCILOGEX），恒温水浴锅（上海一恒），磁力搅拌器。

3.2.5 试剂配制

表 3.2 试剂配制

Tab3.2 reagent compounding	
名称	配制方法
10%APS (1mL)	称取 0.1g APS 溶于 1mL 超纯水。
10%SDS (10mL)	称取 1g SDS 溶于 9mL 超纯水定容至 10mL，室温保存。
5x 蛋白上样缓冲液	吸取 1 M Tris-HCL (pH6.8) 1.25mL，甘油 2.5mL；称取 SDS 0.5g，溴酚蓝 0.025g，用超纯水定容至 5mL，分装与 1.5mL EP 管中，500 μ L/份，保存于-20 冰箱，用之前加入 25 μ L 巯基还原剂。
1xTAE (1L)	取 20mL 50 $\times$ TAE 加入 980mL 超纯水混匀。
2YT 培养基	称取蛋白胨 6.4g，酵母粉 4g，NaCl 2g 溶于 400mL 超纯水后灭菌。

续表 3.2 试剂配制

Continued Tab3.2 reagent compounding

名称	配制方法
100mM IPTG	称取 0.7149g 于 30mL 娃哈哈水中，0.22 滤膜过滤除菌。
1M Tris	称取 60.57g Tris 于 400mL 超纯水中，调节 pH 至 8.0 后定容至 500mL。
5M 咪唑	取 170.25g 咪唑于 400mL 超纯水中，调节 pH 至 8.0 后定容至 500mL。
5M NaCl	取 146.1g NaCl 定容至 500mL。
NiA	25mM Tris，500mM NaCl，25mM 咪唑。
NiB 洗杂液	25mM Tris，500mM NaCl，80mM 咪唑。
NiB 洗脱液	25mM Tris，500mM NaCl，250mM 咪唑。
0.1M NiSO ₄	取 13.14g NiSO ₄ ·H ₂ O 定容至 500mL 超纯水中，0.22μm 的滤膜过滤。
1M NaOH	取 16g NaOH 定容至 400mL 超纯水中，0.22μm 的滤膜过滤。

3.3 方法

3.3.1 质粒构建

本小节所构建的载体分别为 p3.1 s2 nsp7 myc flag Q18A Q34A 、 p3.1 s2 nsp7 Qmu myc flag 、 PCZN1-s2 nsp7 myc flag his 和 PCZN1-s2 nsp5 his。NSP7 上除了最后一个氨基酸是 Q，剩余还有 5 个 Q 位点分别为 Q18 Q34 Q19 Q31 Q63，表 3.3 为构建上述质粒设计的引物。

表 3.3 引物信息

Tab3.3 Primer information

引物名称	引物序列 (5'-3')
S2 NSP7-1F	ACACCATGAATCACAAAGTGGAGCAGAAGCTGATCAGCGA TTGTCGTCGTCATCCTTGT

续表 3.3 引物信息

Continued Tab.3.3 Primer information

引物名称	引物序列 (5'-3')
S2 NSP5-1F	AAGAGGTAATACACCATGAGTGGTTTTAGGAAAATGGCATTCCC
S2 NSP5-1R	GCAGAGATTACCTATCTAGTCAATGATGATGATGATGATGAGCGTA ATCTGGAACATCGTATGG
S2NSP7Q18A-1F	GTTTAAACTTAAGCTGCCACCATGGAGCAGAAGCT
S2NSP7Q18A-1R	TCTCCACTCTGAGCTGTGCGAGCACGCTCAGCA
S2NSP7Q18A-2F	TGCTGCTGAGCGTGCTCGCACAGCTCAGAGTGGAGA
S2NSP7Q18A-2R	CTGGACTAGTGGATCTCACTTGTCGTCGTCATCCT
S2NSP7Q34A-1F	GTTTAAACTTAAGCTGCCACCATGGAGCAGAAGCT
S2NSP7Q34A-1R	GATGTCGTTGTGCAGTGCAACGCACTGTGCCCACAGCTT
S2NSP7Q34A-2F	TGGGCACAGTGCGTTGCACTGCACAACGACATCCTGCT
S2NSP7Q34A-2R	CTGGACTAGTGGATCTCACTTGTCGTCGTCATCCT
S2NSP7Q31A-1F	GTTTAAACTTAAGCTGCCACCATGGAGCAGAAGCT
S2NSP7Q31A-1R	AGTGCAACGCATGCTGCCCACAGCTTGCTGCTGCTCTCCAC TCTGAGTGCTGCGAGCACGCTCAGCAG
S2NSP7Q31A-2F	GCGTGCTCGCAGCACTCAGAGTGGAGAGCAGCAGCAAGCT GTGGGCAGCATGCGTTGCACTGCACAAC
S2NSP7Q31A-2R	CTGGACTAGTGGATCTCACTTGTCGTCGTCATCCT
S2 NSP7-Q63A-1F	GTTTAAACTTAAGCTGCCACCATGGAGCAGAAGCT
S2 NSP7-Q63A-1R	TTATTGATGTCCACGGCCCCCTGCCATGGACAGGAGGACGCT
S2 NSP7-Q63A-2F	GTCCTCCTGTCCATGGCAGGGGCCGTGGACATCAATAA
S2 NSP7-Q63A-2R	CTGGACTAGTGGATCTCACTTGTCGTCGTCATCCT
S2 NSP7-Q19A-1F	GTTTAAACTTAAGCTGCCACCATGGAGCAGAAGCT
S2 NSP7-Q19A-1R	TGCTCTCCACTCTGAGTGCTGCGAGCACGCTCAGCAGCA
S2 NSP7-Q19A-2F	TGCTGCTGAGCGTGCTCGCAGCACTCAGAGTGGAGAGCA GCAGCAA
S2 NSP7-Q19A-2R	CTGGACTAGTGGATCTCACTTGTCGTCGTCATCCT

3.3.2 尿素胶的制作

(1) 分离胶的配制：称取尿素 4.32g 加入 49.5%T 5%C 4.85mL，3×凝胶缓冲液 4mL 加超纯化水至 12mL 混匀，加入 40μL APS%和 4μL TEMED 混匀后倒入玻璃板中，用 20%无水乙醇溶液封胶，待其凝固 30min；

(2) 夹层胶的配制：称取尿素 4.32g 加入 49.5%T %C 2.42mL，3×凝胶缓冲液 2mL，加超纯化水至 6mL 混匀，加入 20μL APS%和 2μL TEMED 混匀后倒入玻璃板中，用 20%无水乙醇溶液封胶，待其凝固 30min；

(3) 浓缩胶的配制：称取尿素 4.32g 加入 49.5%T %C 0.49mL，3×凝胶缓冲液 2mL 加超纯化水至 6mL 混匀，加入 40μL APS%和 4μL TEMED 混匀后倒入玻璃板中，插入尺梳，待其凝固 30min；

3.3.3 原核表达纯化

(1) 菌种活化：挑一单菌落到 5mL 2YT 的 15mL 的摇菌管中，放至于摇床培养 12h，培养条件为 37°C、220rpm；培养基中氨苄青霉素（Amp）与 2YT 的比例为 1:1000。

(2) 菌种扩大培养：在超净工作台中取 4mL 培养液置于 400mL 的培养基中，添加 400μL 氨苄青霉素，置于摇床中培养至 OD 值为 0.6~0.8。

(3) 诱导：用移液枪吸取 1mLIPTG（100mM）置于上一步培养液中，使其终浓度为 0.25mM；培养条件为 16°C、180rpm，培养时间为 12h。

(4) 离心：将上一步培养液转移至 50mL 离心管中离心，离心条件为 4°C、6500rpm、20min，离心后去除上清，获得菌体沉淀。

(5) 破胞：后续步骤冰上操作，用 20mL NiA 重悬菌液，于超声波粉碎仪中粉碎菌体，条件为超声 2s，停 3s，超声时间为 10min，超声后取样。

(6) 离心：将上一步破胞液离心 1h、13000rpm、4°C，离心后的上清用 0.45 μ m 滤膜过滤除菌并取样。

(7) 预处理镍柱：用体积为镍柱 3 倍体积的平衡液过柱。

(8) 流穿：将第（6）步获得的上清液流穿镍柱两次后取样。

(9) 洗杂：将洗杂液置于镍柱中流穿两次，5mL/次。

(10) 洗脱：将洗脱液置于镍柱中流穿三次，5mL/次。

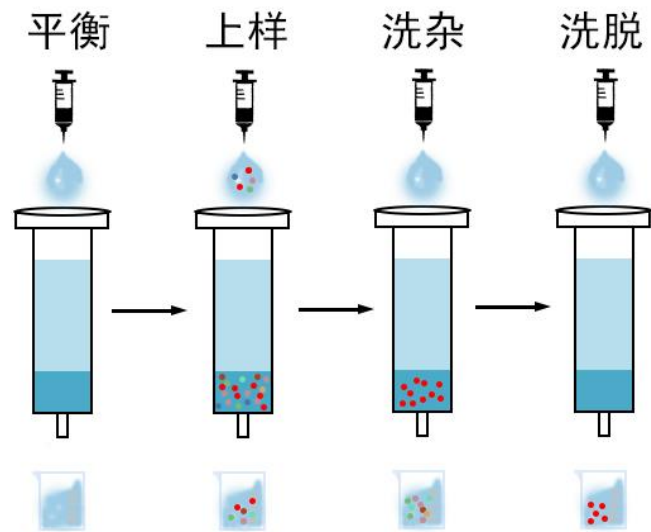


图 3.1 蛋白纯化原理图

Figure3.1 The schematic diagram of protein purification

3.3.4 无细胞酶切

将已纯化的 S2 NSP7 与 S2 NSP5 混匀后于 37℃ 孵育 2.5h，反应缓冲液成分包括 1 mM EDTA，1 mM DTT，150 mM NaCl 和 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)。

3.4 实验结果

3.4.1 S2 NSP7 突变体质粒构建

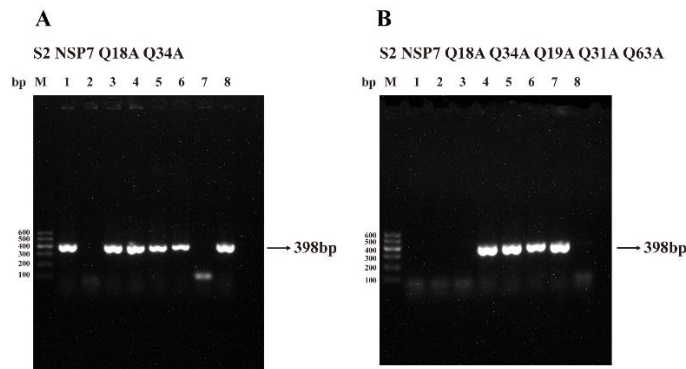


图 3.2 S2 NSP7 切割位点突变体质粒构建

Figure3.2 Construction of S2 NSP7 cutting site mutant plasmid

注： A： NSP7 Q18A Q34A 突变体载体构建菌液 PCR 结果； B： NSP7 Q18A Q19A Q34A Q34A Q69A 突变体载体构建菌液 PCR 结果。

如图 3.2 是构建 p3.1 s2 nsp7 myc flag Q18A Q34A 、p3.1 s2 nsp7 Qmu myc flag (Qmu: 将 S2 NSP7 上的所有 Q 位点全部突变为 A, 包括 Q18 Q34 Q19 Q31 Q63) 转化后挑取 8 个单克隆的菌液 PCR 结果, 筛选条带正确的克隆后送测, 如图 3.3 测序结果均正确。

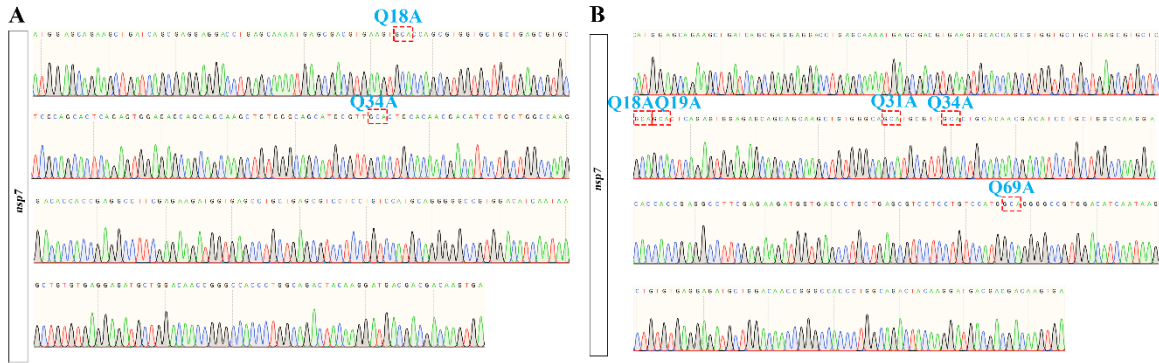


图 3.3 S2 NSP7 切割位点突变体质粒测序结果

Figure3.3 The sequencing results of S2 NSP7 cutting site mutant plasmid

注: A: NSP7 Q18A Q34A 突变载体构建测序结果; B: NSP7 Q18A Q19A Q34A Q31A Q69A 突变载体构建测序结果。

3.4.2 S2 NSP7 预测切割位点突变验证

上一章中证明 NSP5 可以切割 NSP7, 但切割产物仍不明确, 接下来将通过寻找切割位点明确切割产物。当 NSP7 切割位点突变后 NSP5 将无法切割 NSP7 使 NSP7 主带不呈现递减趋势。本实验先后构建了 Q18 和 Q34 位点同时突变以及 Q 位点全部突变的突变体。将 NSP7 及 NSP7 突变体质粒量定为 1 μ g, 分别与 NSP5 共转, NSP5 的量为 0, 330ng, 500ng, 1 μ g, 2 μ g, 3 μ g。通过 Western blot 检测 NSP7 主带的变化趋势, 如图 3.4 (A) 所示, 当 Q18 和 Q34 位点突变后, NSP5 量逐渐增多, NSP7 的递减趋势确依然存在, 说明 NSP7 上的切割位点不仅仅是 Q18 和 Q34, 可能还存在其他切割位点。将突变体 NSP7 (Q18A、Q34A、Q19A、Q31A、Q63A) 与 NSP5 按上述转染比例共转。如图 3.4 (B), NSP7 (Q18A、Q34A、Q19A、Q31A、Q63A) 主带的量随着 NSP5 量的增加而逐渐降低, 提示 NSP7 的切割位点可能不止 Q 位点, 可能存在 Q 以外的其他切割位点。有文献表明 S2 NSP5 的 P1 位点也可能是 E^[90], 据此将 NSP7 上所有的 E 位点全部突变为 A。将突变体 NSP7 (Q18A、Q34A、Q19A、Q31A、Q63A、E23A、E47A、E50A、E73A、E74A, 简称为 EQmu) 与 NSP5 共转, 结果显示随 NSP5 量的增多, NSP7

(EQmu) 主带的量不呈递减趋势，提示 NSP5 不对 NSP7 (EQmu) 进行切割，进一步说明 NSP5 在 NSP7 上的切割位点为 Q 或 E。

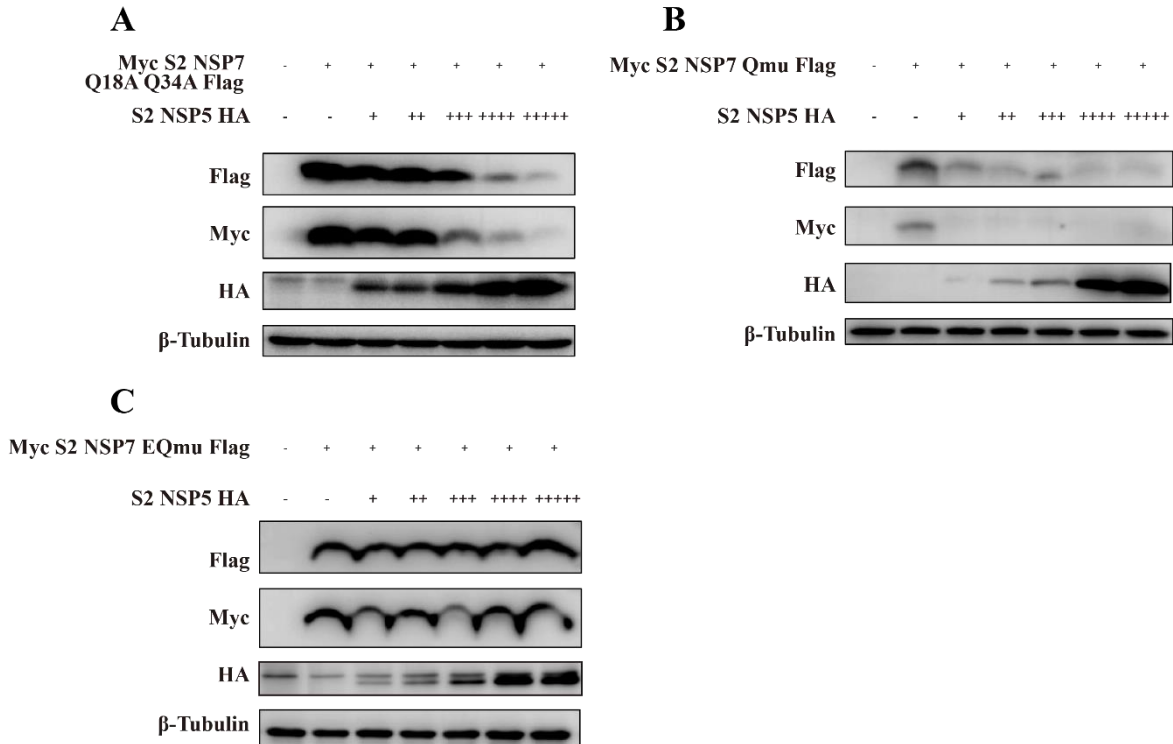


图 3.4 新冠病毒 NSP5 对 NSP7 Q 和 E 切割位点筛选

Figure3.4 The screening of SARS-CoV-2 nsp5 cleaves NSP7 at Q and E

注：A：NSP5 切割 NSP7 Q18A Q34A；B：NSP5 切割 NSP7 Qmu，Qmu 指 NSP7 上所有的 Q 位点都变为了 A，包括（Q18 Q34 Q19 Q31 Q63）；C：NSP5 切割 NSP7 EQmu，EQmu 指 NSP7 上所有的 E 和 Q 位点都变为了 A，包括 Q18、Q34、Q19、Q31、Q63、E23、E47、E50、E73 和 E74；

根据 NSP7 的预测切割位点也可能是 E，比对 7 种不同冠状病毒 NSP7 序列，结果显示 E 酶切位点可能也与冠状病毒的强致病性相关；

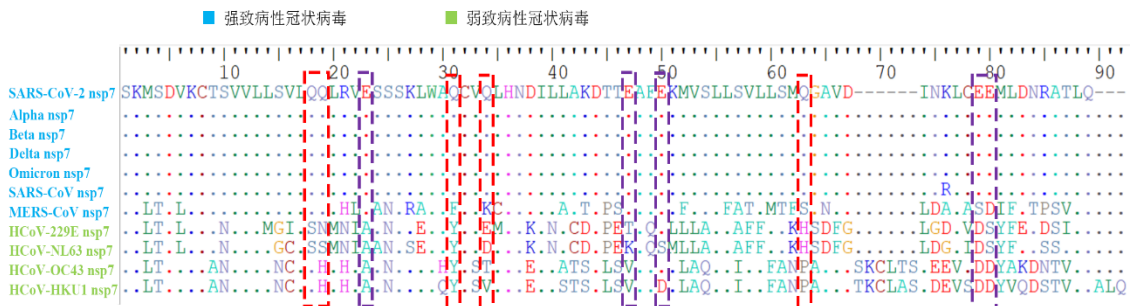


图 3.5 图 2.4 NSP5 在 NSP7 的预测切割位点

Figure3.5 Predictive cleavage sites of NSP5 in NSP7

3.4.3 S2 NSP5 及 S2 NSP7 原核表达质粒构建

如图 3.6 是构建 pCZN1 s2 nsp7 myc flag his 挑取 8 个单克隆的菌液 PCR 结果，筛选条带正确的克隆后送测，测序结果正确。

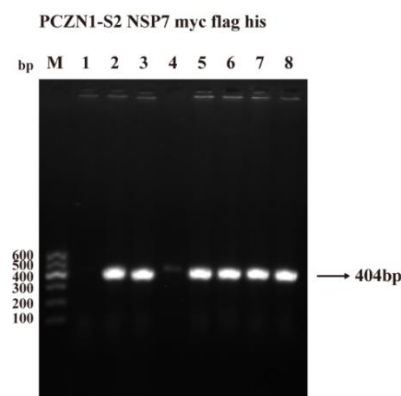


图 3.6 S2 NSP7 原核表达载体构建

Figure3.6 The construction of S2 NSP7 prokaryotic expression vector

3.4.4 S2 NSP5 与 S2 NSP7 的原核表达纯化

原核表达所质粒表达的 NSP7 大小约为 12.8kD，图 3.7 （A）中 NSP7 在全菌液的裂解液中很明显，洗杂液中不存在 NSP7，洗脱液中存在 NSP7，说明其成功与镍柱结合，并被洗脱液洗脱下，NSP7 原核表达成功。新冠病毒 NSP5 的理论相对分子质量约为 35.84kD，有文献报道 NSP5 原核表达纯化的大小在 25-35kD 之间，与理论大小不一致，如图 3.7 （C）本实验结果与文献一致，NSP5 可能发生自切使相对分子质量减少，但不影响其酶切活性。

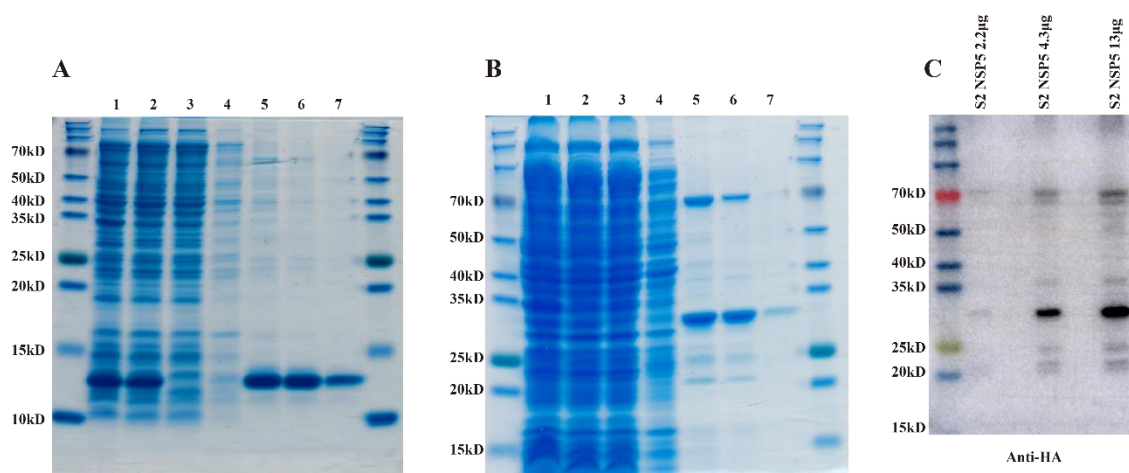


图 3.7 NSP7 与 NSP5 的原核表达纯化

Figure 3.7 The prokaryotic expression purification of NSP7 and NSP5

注：A：原核表达后过镍柱纯化得到的 S2 NSP7；1 代表裂解后全菌液；2 代表裂解液离心后的上清；3 代表过镍柱流穿液；4 代表洗杂液；5 代表第一次洗脱目的蛋白的液体；6 代表第二次洗脱目的蛋白的液体；7 代表第三次洗脱目的蛋白的液体；B：为原核表达后过镍柱纯化得到的 S2 NSP5，1-7 序号同 A 图；C：Western blot 检测 S2 NSP5。

3.4.5 S2 NSP5 与 S2 NSP7 的无细胞酶切

为检测分子质量相对较小的新冠病毒 NSP7 切割条带，本实验用尿素胶检测分子质量较小的 NSP7 切割片段。NSP7 为 100 μ g，NSP5 以 33 μ g、100 μ g 和 300 μ g 逐渐增大，即 NSP7 与 NSP5 量的比例分别为 3:1、1:1 和 1:3。如图 3.8A 所示，与对照组 NSP7 和对照组 NSP5 相比，NSP7+NSP5 在 6.5kD 和 3.3kD 处检测到切割条带，且随着 NSP5 的量逐渐增大，6.5kD 处的切割条带存在明显增大趋势。图 3.8 B 为通过 Western blot 进一步验证 NSP7 切割条带，Flag 抗体检测到 6.5kD 处有条带，但 NSP5 泳道中也存在一个接近 6.5kd 处的条带，说明 6.5kD 处的条带是非特异性条带。Flag 抗体检测到 3.3kD 处也有条带，该条带极有可能为切割条带（图 3.6 中切割产物 1），切割位点可能是 73E（2.95kD）或者 74E（2.82kD）。Myc 抗体检测到 3 个切割产物，相对分子质量分别为 6.5kD（切割产物 2）、3.3kD（切割产物 3）、小于 3.3kD（切割产物 4）。切割产物 2 可能就是尿素胶上检测到的递增条带，切割位点可能是 47TE（7.04kD）；切割产物 3 的预测切割位点为 18LQ（3.73kD）、19QQ（3.86kD）或者 23VE（4.36kD）。Myc 存在 EQ 位点，切割产物 4 可能为该位点和 18LQ、19QQ 或者 23VE 切割位点同时切割形成的切割产物。综上所述，部分揭示 NSP5 作用于 NSP7 的分子机制。NSP5 在 NSP7 上至少存在三个切割位点产生 4 个切割产物，第一个切割位点可能是 18Q、19Q 和 23E，第二个切割位点是 47E，第三个切割位点可能是 73E 或者 74E。切割位点 1 和切割位点 2 仍不明确，后续还需将其突变进一步观察切割条带。

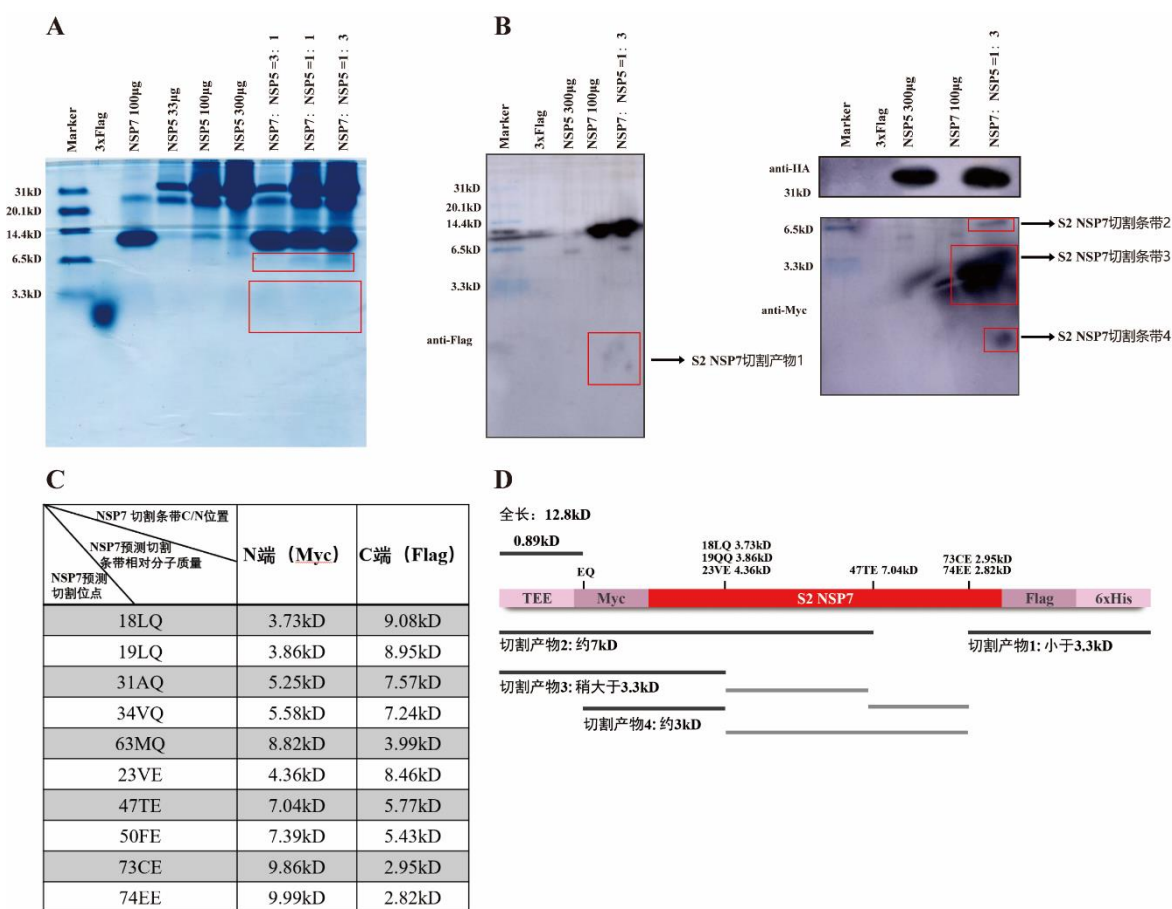


图 3.8 新冠病毒 NSP5 与 NSP7 的无细胞酶切

Figure3.8 The cell-free cleavage of SARS-CoV-2 protein NSP5 and NSP7

注：A：新冠病毒 NSP5 与 NSP7 无细胞酶切反应尿素胶结果；B：NSP5 与 NSP7 无细胞酶切 Western blot 结果；C：NSP7 预测切割位点形成的切割产物相对分子质量；D：NSP7 切割条带示意图，是根据 Western blot 检测到的 NSP7 切割条带推测的预测切割位点，黑色为实验已检测到的切割产物，灰色为可能存在的切割产物，切割产物序号与 B 图中的切割条带序号对应；

3.5 讨论与小结

综上所述，尿素胶显示新冠病毒 NSP7 与 S2 NSP5 反应后出现一条新条带（大约 7-8kD），WB 结果显示 N 端存在三个切割条带，C 端存在一个切割条带。提示 S2 NSP5 在 S2 NSP7 上至少存在三个切割位点产生 4 个切割产物，根据切割产物的相对分子质量推测切割位点可能有 18Q、19Q、23E、47E、73E、74E。该实验为无细胞酶切结果，而体外酶切只检测到了 Q18 处产生的切割条带，可能是其他位点产生的切割条带量较少，仍需增大体外酶切的量在细胞中验证酶切位点。

4 S2 NSP5 切割 S2 NSP7 产生的切割产物的亚细胞定位

4.1 引言

SARS-CoV-2 是一种 RNA 病毒，可以复制其基因组，翻译蛋白质，并在细胞质中组装后代病毒颗粒。它在复制周期的几乎所有阶段都依赖于宿主细胞的基础结构和代谢。与其他新冠病毒非结构复制酶蛋白一样，NSP7 通常定位于细胞质且与 NSP8 共定位，主要与 NSP8 作为复制酶的辅助因子激活 NSP12 的活性在 RNA 合成中发挥作用^[102-103]。此外，NSP7、NSP8 和 NSP12 之间的相互作用在 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 中是保守的^[103]。

前一章已经确定 SARS-CoV-2 NSP5 可以切割 NSP7，且检测到了切割条带。本章将在此基础上，通过细胞免疫荧光实验和生物素-链亲和素标记细胞膜蛋白实验来探究 NSP7 与 NSP7 切割产物亚细胞定位的区别，这将补充 SARS-CoV-2 NSP7 切割产物的亚细胞定位的理论基础，为深入研究 SARS-CoV-2 的致病机制提供科学依据。

4.2 材料

4.2.1 细胞、菌株

HEK-293T 由本实验室保存；DH5 α 菌株由本实验室保存。

4.2.2 质粒

s2 nsp7、*s2 nsp5* 基因信息来自 NCBI (NC_045512.2)。基因通过密码子优化后由擎科生物科技有限公司合成 p3.1 *s2 nsp5 myc*，p3.1 *s2 nsp7 myc flag*。

4.2.3 试剂

表 4.1 实验试剂

Tab4.1 Experimental reagents

名称	厂家
EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin , Alexa Fluor™ Plus488, Alexa Fluor™ Plus 594	中国赛默飞世尔科技有限公司

续表 4.1 实验试剂

Continued Tab4.1 Experimental reagents

名称	厂家
NeutrAvidin™ UltraLink™ Resin	
BSA 粉末	武汉博士德生物工程有限公司
爬片 (φ14mm)	NEST
HA 标签抗体	武汉亚克因生物技术有限公司
Myc、His 和 Flag 标签抗体	武汉三鹰生物技术有限公司
4%多聚甲醛	Biosharp
Triton X-100、EDTA 、DAPI、甘氨酸、明胶封片剂	北京索莱宝科技有限公司
CaCl ₂ ·2H ₂ O, KCl ₂ , MgCl ₂ , Tris cocktail	国药集团化学试剂有限公司
MCE	
KH ₂ PO ₄	天津市大茂化学试剂厂
SDS, NaCl, DTT	生工生物工程（上海）股份有限公司
Bromophenol blue	Diamond

4.2.4 试剂配制

表 4.2 试剂配制

Tab4.2 reagent compounding

名称	配制方法
0.5%Triton X-100	取 10mL 1×PBS, 加入 50μL Triton-100, 现配现用
DPBS ⁺	分别称取 0.065g CaCl ₂ ·2H ₂ O、0.1g KCl ₂ 、0.1g KH ₂ PO ₄ 、0.0225g MgCl ₂ 、4g NaCl 和 1.4425g Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O , ddH ₂ O 加至 500mL 溶解并灭菌备用。
LB1	50mM Tris/HCl pH7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA。
LB2	取 0.2mL TritonX-100 加入 20mL LB1 中,

续表 4.2 试剂配制

Continued Tab4.2 reagent compounding

名称	配制方法
LB3	低温低速涡旋溶解 1h。 10mL LB2 里加一片蛋白酶抑制剂 cocktail。
PBS	0.24g KH_2PO_4 、8g NaCl、0.2g KCl 和 3.63g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，ddH ₂ O 加至 1L 溶解并灭菌备用。
SWS	取 70mL PBS，加入 0.1mL TritonX-100 搅拌溶解，调 pH 至 7.4。
100mM 甘氨酸	称取 0.375g 甘氨酸，DPBS ⁺ 定容至 50mL
20mM 甘氨酸	称取 0.075g 甘氨酸，DPBS ⁺ 定容至 50mL
生物素溶液	1mg 生物素中加入 400 μL PBS

4.2.5 实验仪器

本实验用到的仪器主要有：垂直混匀仪（NEST），真空浓缩离心机（eppendorf），倒置荧光显微镜（Nikon），恒温金属浴（Monad），激光共聚焦（ZEISS）。

4.3 方法

4.3.1 细胞免疫荧光

（1）制备爬片：先加入 200 μL 10% DMEM 培养基置于 24 孔板，湿润底部，然后将爬片放入 24 孔板底部，每孔铺板 10 万细胞，放入 5%二氧化碳细胞培养箱中过夜培养至合适密度后转染（方法同第二章 2.3.7），转染 24h 后进行免疫荧光；

（2）1 $\times$ PBS（1mL/皿）洗 3 次，5min/次；

（3）4%多聚甲醛（1mL/孔）固定 30min，1 $\times$ PBS 洗 3 次；

（4）0.5%Triton X-100（1mL/孔）打孔 25min，1 $\times$ PBS 洗 3 次；

（5）1%BSA（200 μL /孔）37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1h；

（6）一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育，0.1%PBST 洗 3 次，每次 5min；

- (7) 二抗 37°C避光孵育 1h, 0.1%PBST 洗 3 次;
- (8) 加入 200 μ L DAPI (200 μ L/孔) 室温避光染色 5min;
- (9) 0.1%PBST 清洗 3 次;
- (10) 封片: 100°C加热明胶封片剂, 滴加在载玻片上, 取出爬片并盖在载玻片上, 5min 后共聚焦观察;
- (11) 使用激光共聚焦显微镜观察并保存结果。

4.3.2 细胞膜蛋白检测

- (1) 全程在冰上处理, 以 HEK293 细胞为例;
- (2) 5mm 培养皿中铺细胞 2.1×10^5 个, 在转染当天达到 70%的密度, 转染 48h 后进行细胞表面蛋白生物素化处理;
- (3) 用 1mL 冷的 DPBS+洗细胞两次;
- (4) 加入 400 μ L 生物素溶液(生物素溶于 DPBS+中浓度为 2.5 mg/mL), 在冰上轻摇培养细胞 30min;
- (5) 用 1mL 冷的 100mM 甘氨酸 (溶于 DPBS+) 在冰上轻摇洗 5min, 洗三次;
用 1 mL 冷的 20 mM 甘氨酸 (溶于 DPBS+) 在冰上轻摇洗 5min, 洗三次;
- (6) 加 200 μ L 裂解缓冲液 LB3 到孔中, 用细胞刮刀分离细胞, 将细胞裂解液收集在 1.5 mL 的试管中;
- (7) 裂解时, 将试管置于冰上低速旋转 1h;
- (8) 当进行裂解时, 制备固定化/ NeutrAvidin Ultralink 珠子:每个样品取 40 μ L NeutrAvidin 珠子, 用 0.5 mL DPBS+洗两次, 再用 0.5 mL LB2 洗两次(每次在 $3000 \times g$, 4°C 下离心 30s, 去除上清)。最后一次洗涤后, 用 20 μ L LB3 重悬珠子。
- (9) 细胞裂解后在 $16000 \times g$ (最大速度)4°C 下离心 15min;
- (10) 将上清转移至 1.5mL 离心管中, 取 10-15%在另一管中(作为 Input 样品, 剩余为 Pull down 样品), 并在-80°C 下保存;
- (11) 将蛋白样品与步骤 8 制备的 40 μ L NeutrAvidin 珠子在 4°C 混匀仪上过夜孵育;
- (12) 孵育结束后在 4°C 下, $16000 \times g$ 离心 30s, 去除上清;
- (13) 用 LB3 洗一次, LB2 洗两次, SWS 洗两次, LB1 洗一次; 每次加入 1 mL 对应的溶液, 在 4°C 下, $16000 \times g$ 离心 30s, 去除上清;
- (14) 加入 25 μ L 的 2xloading buffer 重悬, 70°C加热 10min, 样品保存在-20°C, 用于 SDS-PAGE 和 Western blot;

4.3.3 细胞外蛋白检测

本实验采用 6cm 皿，实验设计为 3 组，第一组为阴性对照（pcDNA3.1），第二组为阳性对照（新冠病毒 ORF8，已有研究证明 S2 ORF8 分泌至细胞外），第三组为 NSP7 实验组。每组转染质粒总量为 7.5 μ g。

（1）细胞铺板：转染前一天将 200 万细胞接种于 6cm 皿，细胞培养箱（37 $^{\circ}$ C，5% CO₂）中培养 12-18h，第二天细胞汇合度约为 80%即可进行下一步；

（2）转染：此步骤参考 2.3.7；

（3）获得细胞外液：转染 48h 后，吸取细胞外液于离心机中离心（4000rpm 4 $^{\circ}$ C；15min）以排除细胞外液中少许悬浮的死细胞；将离心得到的上清用 0.22 μ m 的滤膜过滤除杂质；

（4）浓缩：将上一步获得的细胞外液置于旋涡仪蒸干体积至 400 μ L，后用 5 $\times$ loading buffer 煮样；

4.4 实验结果

4.4.1 新冠病毒 NSP7 切割产物的亚细胞定位

本实验采用激光共聚焦显微镜检测新冠病毒 NSP7 及其切割产物的亚细胞定位。NSP7 的 C 端带有 Flag 标签，N 端带有 Myc 标签。实验设为 3 组，分别为 NSP7，NSP7+NSP5、NSP7+NSP5 GC376 处理组，将相关质粒按这三组分别转染至 293t 细胞。结果如图 4.1 所示，单独瞬转 NSP7，新冠病毒蛋白 NSP7 定位于细胞质，此结果与已有报道结果一致；将 NSP5 与 NSP7 共转，NSP7 大部分定位于细胞质，但有少部分 NSP7 预测切割片段可能定位于细胞核；GC376 处理 12h 后，定位于细胞核的成分消失。根据上述结果可得出结论 NSP7 切割产物可能定位于细胞核，提示 NSP7 的切割产物可能有不同于 NSP7 的功能。

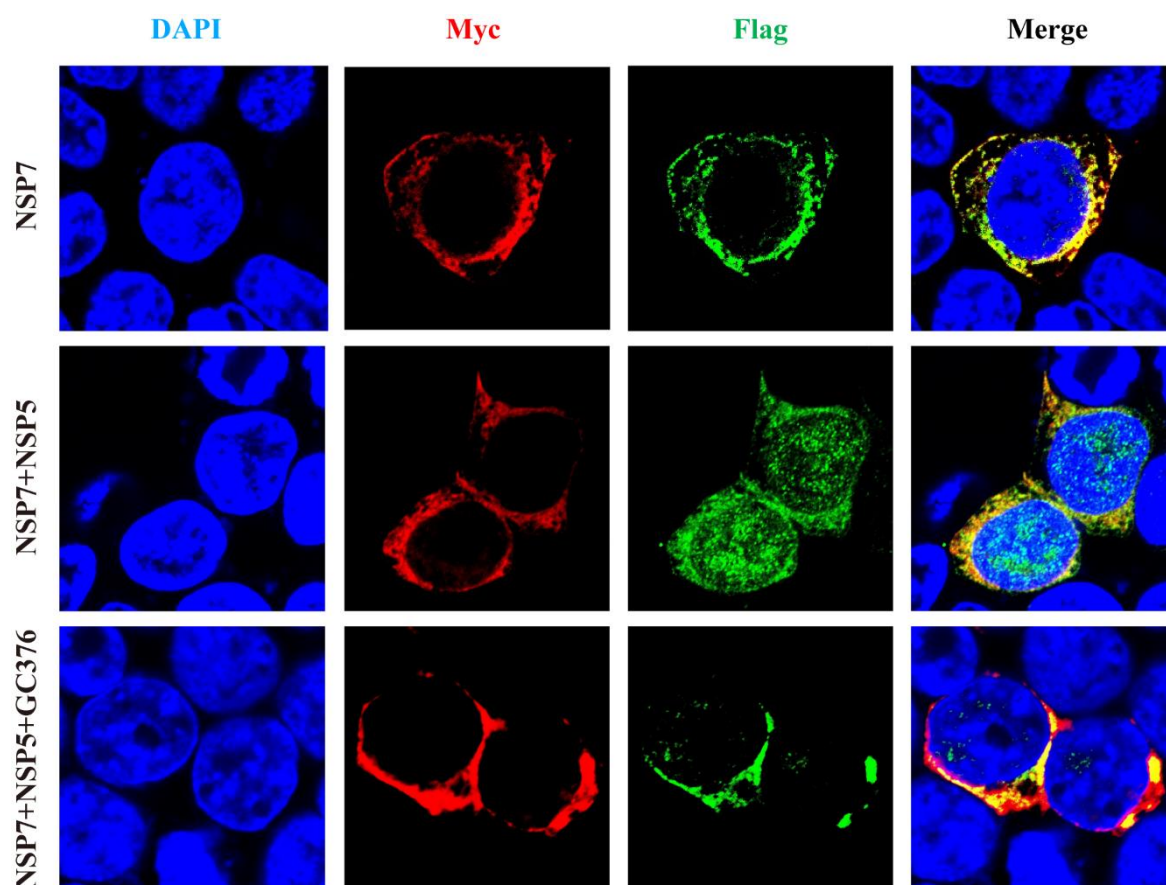


图 4.1 新冠病毒蛋白 NSP7 及其切割产物的亚细胞定位

Figure4.1 Subcellular localization of SARS-CoV-2 protein NSP7and cleavage products

4.4.2 新冠病毒 NSP7 在细胞膜的检测

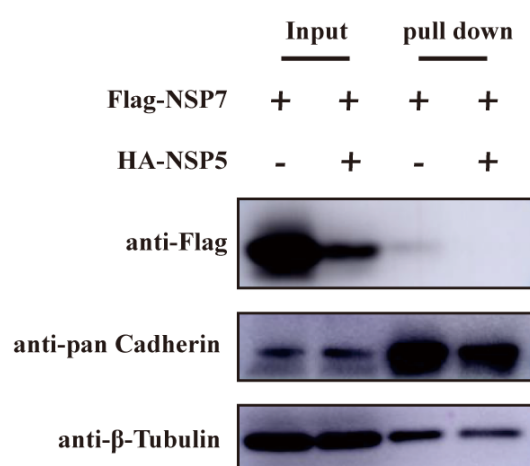


图 4.2 S2 NSP7 细胞膜的检测

Figure4.2 The detection of S2 NSP7 cell membrane

本实验选用 pan Cadherin 抗体作为细胞膜内参，钙粘蛋白是介导钙依赖性细胞

-细胞粘附的单链糖蛋白受体，因此可作为细胞膜的内参。图 4.2 为利用链亲和素下拉被生物素标记的细胞膜蛋白检测结果，Western blot 显示细胞膜存在少量 NSP7，当 NSP7 被 NSP5 切割后条带消失；NSP7 的细胞膜检测结果表明 NSP7 在细胞膜有分布，NSP5 切割 NSP7 后定位于细胞膜的 NSP7 消失，说明 NSP7 被 NSP5 切割后会其影响其在细胞膜的定位，与 4.2.1 结果相互呼应，NSP7 切割产物与 NSP7 可能定位不一致，其可能定位到了细胞核。NSP7 定位于膜上提示其功能可能与细胞外信号传递有关。

4.4.3 新冠病毒 NSP7 在细胞外的检测

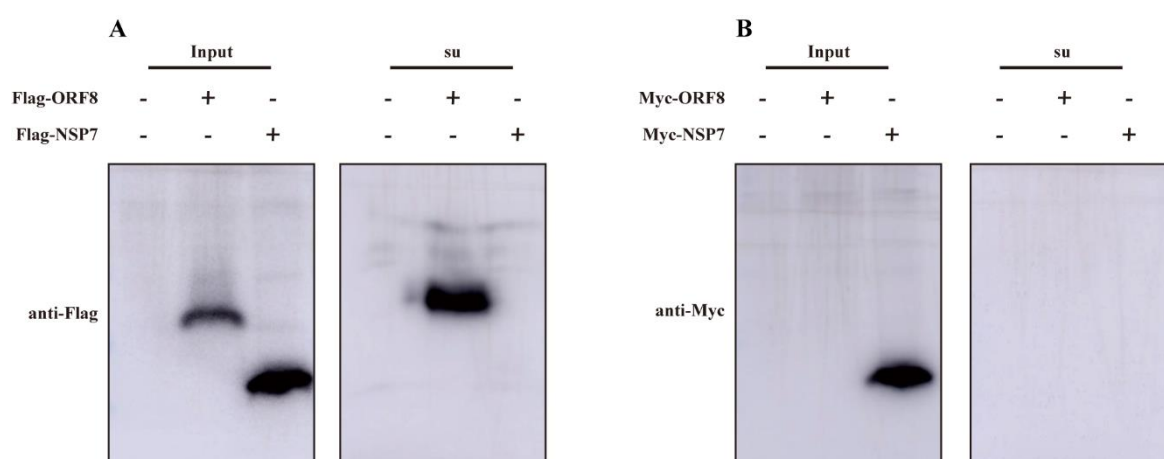


图 4.3 S2 NSP7 细胞外的检测

Figure4.3 The detection of S2 NSP7 extracellular

注：Input 组为裂解细胞后的样，细胞外是用细胞培养外液检测的，细胞外用 su 表示；ORF8 的 myc 标签位于 N 端，Flag 位于 C 端，A：anti-Flag 检测 NSP7 是否分泌至细胞外；B：anti-Myc 检测 NSP7 是否分泌至细胞外；anti-Flag 抗体检测到 ORF8 分泌到细胞外，但 myc 检测不到，可能是因为 ORF8 的 N 端在细胞中被切除。

细胞外检测以 S2 ORF8 作为阳性对照，Kazuhiro Matsuoka 等研究发现大约 41% 在 293T 细胞中表达的 ORF8 作为糖蛋白二聚体分泌到细胞外^[96]。NSP7 的 N 端带 Myc 标签，C 端带 Flag 标签，如图 4.3 Western blot 结果显示 Myc 抗体和 Flag 抗体都没有检测到 NSP7 的存在，说明新冠病毒 NSP7 不分泌至细胞外。

4.5 讨论与小结

本章基于新冠病毒中 NSP5 切割 NSP7，探究切割对 NSP7 亚细胞定位的影响。

与已有研究报道^[115]不一致的地方是，本研究表明 NSP7 主要定位于细胞质，但还有少部分定位于细胞膜，当 NSP5 切割 NSP7 后，NSP7 切割产物可能部分定位于细胞核，这表明 NSP7 与 NSP7 切割产物具有不同的亚细胞定位，提示 NSP7 与 NSP7 切割产物具有不同的功能。

5 新型冠状病毒 NSP7 切割产物功能的初步研究

5.1 引言

SARS-CoV-2 病毒蛋白在人体中参与到广泛的细胞生物学过程，已有研究通过亲和纯化质谱技术鉴定了与 SARS-CoV-2 NSP7 蛋白相关的宿主蛋白，其互作蛋白参与的生物学过程包括电子传递、膜运输、GPCR 信号转导^[78-81]。NSP7 还存在与 T 调节细胞表位(Tregitope 289)同源的序列，NSP7-289 在体外结合多个 HLA-DRB1 等位基因，抑制 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞记忆反应^[84]。本课题前期实验已证实 S2 NSP5 切割 S2 NSP7，且检测到了切割条带，NSP7 切割产物可能与 NSP7 功能存在差异，为深入研究 NSP7 切割产物的功能，我们通过亲和纯化质谱联用技术（IP-MS）寻找与 NSP7 切割片段相互作用的蛋白；通过流式细胞术检测 NSP7 与 NSP7 切割产物对 T 细胞活性影响的差异。

本实验通过 IP-MS 筛选出 8 个候选蛋白后进行 Co-IP 实验验证互作。此外，还采用抗体 CD3 和 CD28 激活 T 细胞活化^[105]，通过流式细胞仪检测细胞表面 CD25-PE 和 CD69-FITC 的荧光强度，比较 NSP7 与其切割产物对 T 细胞活化的差异。

5.2 材料

5.2.1 细胞、菌株

HEK-293T 由本实验室保存，人 T 淋巴细胞瘤细胞 Jurkat 购自碧云天生物技术；DH5 α 、BL21 菌株由本实验室保存。

5.2.2 质粒

s2 nsp7、s2 nsp5 的基因信息来自 NCBI（NC_045512.2）优化密码子优化后北京擎科生物科技有限公司合成。所用原核表达质粒为本实验前期通过无缝克隆构建载体获得。

5.2.3 试剂

表 5.1 试剂

Tab.5.1 Reagents

名称	厂家
IPKine TM Flag 标签蛋白免疫沉淀试剂盒 (磁珠法)	Abbkine
IPKine TM Myc 标签蛋白免疫沉淀试剂盒 (磁珠法)	
Trizol	Ambion
异丙醇, 无水乙醇	天津市致远化学试剂有限公司
DEPC 水	北京索莱宝科技有限公司
Anti-Hu CD3 OKT3 FG PUR500UG	Invitrogen
Anti-Hu CD28 CD28.2 FG PUR500G	
Anti-Hu CD3 SK7 APC	
Anti-Hu CD25 BC96 PE	
Anti-Hu CD69 FN50 FITC	
EBioscience TM 7-AAD Viability Staining	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
反转录试剂盒, 2×ChamQ Universal	
牛血清白蛋白 BSA-V	Solarbio

5.2.4 实验仪器

本实验用到的仪器主要有：磁力架（Bioss），真空浓缩离心仪（eppendorf），BD 流式细胞仪（BD）；

5.3 方法

5.3.1 亲和纯化-质谱联用技术（IP-MS）

采用 Flag 和 Myc 磁珠进行实验：

（1）转染：设置五组，分别转染 pcDNA3.1、p3.1+NSP7（用于 Flag 磁珠富集）、NSP7+NSP5（用于 Flag 磁珠富集）、p3.1+NSP7（用于 Myc 磁珠富集）、NSP7+NSP5（用于 Myc 磁珠富集）；

- (2) 转染 48h 后收离心收细胞并裂解；
- (3) 按照 IPKine™ Flag 标签蛋白免疫沉淀试剂盒和 IPKine™ Myc 标签蛋白免疫沉淀试剂盒的说明书进行蛋白富集；
- (8) 质谱：将富集好的样品中加入 30μLPBS，送去质谱分析（工作原理图 5.1）。

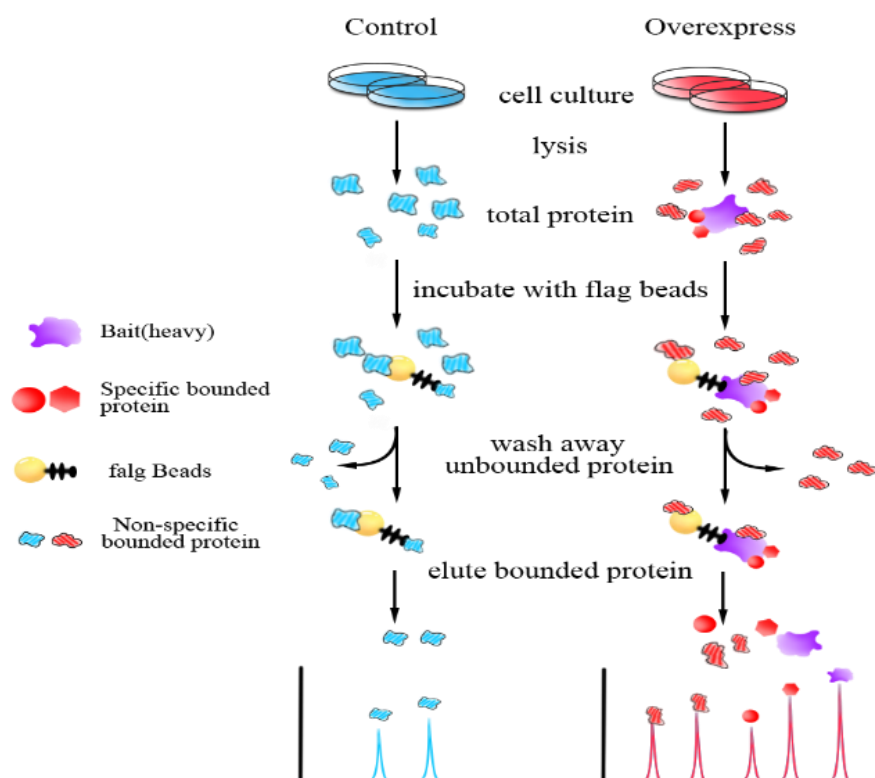


图 5.1 亲和纯化-质谱联用技术（IP-MS）工作原理^[93]

Figure 5.1 The principle of affinity purification - mass spectrometry (IP-MS)^[93]

5.3.2 质谱数据分析

质谱数据筛选标准：通过 iBAQ 值计算 NSP7 和 NSP5+NSP7 的比值再取以 2 为底的对数值，筛选出对数值大于 1 且 iBAQ 较高的就为 NSP7 切割片段潜在互作蛋白。

5.3.3 互作蛋白质粒载体构建

- (1) HEK-293T 细胞总 RNA 的提取，步骤参考 2.3.11。
- (2) RNA 逆转录的步骤参考 2.3.12。
- (2) 引物设计：以下为 PCR 引物信息，ALB、H2BC11、TUBA4A、ATP6V0C、

TUBA1A、*BANF1*、*H2AC8* 的 mRNA 信息来自 NCBI，登录号分别为 NM_000477.7、NM_021058.4、NM_006000.3、NM_001198569.2、NM_001270399.2、NM_001143985.1、NM_021052.4。

表 5.2 PCR 引物信息

Tab.5.2 PCR primer information

引物名称	引物序列 (5'-3')
ATP6V0C-F	GCTAGCGTTTAAACTTAAGCTGCCACCATGTCCGAGTCCAAGAGCGGC
ATP6V0C-R	ACCACACTGGACTAGTGGATCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGG GTACTTTGTGGAGAGGATGAGGGCGA
BANF1-F	GCTAGCGTTTAAACTTAAGCTGCCACCATGACAACCTCCCAAAGCACCGA
BANF1-R	ACCACACTGGACTAGTGGATCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAC AAGAAGGCGTCGCACCACTCT
H2AC8-F	GCTAGCGTTTAAACTTAAGCTGCCACCATGTCTGGACGTGGAAAGCAA
H2AC8-R	ACCACACTGGACTAGTGGATCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGG GTACTTGCCCTTGGCCTTATGGTG
H2BC11-F	GCTAGCGTTTAAACTTAAGCTGCCACCATGCCAGAGCCAGCGAAGTCT
H2BC11-R	ACCACACTGGACTAGTGGATCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGG GTACTTAGCGCTGGTGTACTTGGTGA
TUBA1A-F	GCTAGCGTTTAAACTTAAGCTGCCACCATGCGTGAGTGCATCTCCATC
TUBA1A-R	ACCACACTGGACTAGTGGATCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGG GTAGTATTCCTCTCCTTCTTCCTCACC
TUBA4A-F	TCAATCGCCTCATTAGCCAAATTGTCTCCTCCATCACAGCT
TUBA4A-R	ACCACACTGGACTAGTGGATCTCAAGCGTAATCTGGAACATCG TATGGGTATTCTTCTCCCTCATCCTCGTC
ALB-F	GCTAGCGTTTAAACTTAAGCTGCCACCATGAAGTGGGTAAACCTTTATTTCCC
ALB-R	ACCACACTGGACTAGTGGATCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAT AAGCCTAAGGCAGCTTGACTTGC

5.3.4 免疫共沉淀 (Co-IP)

以 S2 NSP7 切割产物与互作蛋白为例：

(1) 铺板：每皿 2.0×10^6 /皿，每个样品 3 个 6cm 皿；

(2) 转染：分为六组，第一组为阴性对照 p3.1，第二组为 S2 NSP7，第三组为互作蛋白，第四组为 S2 NSP7 和互作蛋白共转染，第五组为 S2 NSP7 切割产物，第六组为 S2 NSP7 和互作蛋白共转染；S2 NSP7 与 S2 NSP5 质量比是 1:1，S2 NSP7 与互作蛋白质量比是 4:1

(3) 4°C 4000rpm 5min 离心收集细胞；

(4) 富集步骤参考 IPKine™ Flag 标签蛋白免疫沉淀试剂；

(5) WB；

5.3.5 流式细胞术

诱导 T 细胞的活化与增殖依赖于双信号和细胞因子：第一信号是 CD3 分子传递抗原刺激信号给 T 细胞，使 T 细胞初步活化，第二信号是 T 细胞与多对共刺激分子相互作用，其中 CD28 是最重要的正性共刺激分子，它能有效刺激 T 细胞合成 IL-2 等细胞因子，促进 T 细胞的增殖和分化^[104]。本实验采用抗体 CD3 和 CD28 激活 T 细胞活化研究切割产物对 T 细胞活化影响。

(1) 刺激板准备：在生物柜中，用 PBS 将抗 CD3 抗体稀释至 1.25μg/ml；在相应的孔中加入 1ml 稀释的抗 CD3 抗体。对于其他不需要抗 CD3 抗体的孔，在孔中加入 1ml PBS。用保鲜膜包好，防止水分蒸发，置于 4 摄氏度过夜；

(2) 刺激 T 细胞：对传代的细胞离心进行计数，将 1×10^6 细胞接种于 24 孔板/孔，相对应的孔中加入抗 CD28 抗体。将 12 孔板放入 37°C，5%二氧化碳的培养箱中培养 48h；

(3) 洗细胞：将细胞充分悬浮吹吸数次以清洁孔，注意尽量不要产生太多气泡。每孔用 1mL FACS 缓冲液洗涤一次，每次 1500rpm 旋转 5 分钟，移去上清液。将细胞重悬于 52μLFACS 缓冲液中混匀；

(4) 染色：加入三个荧光染色 anti-CD69-FITC (0.125μg/管)、anti-CD25-PE (0.25μg/管)、anti-CD3-APC (0.125μg/管)；

(5) 1500rpm 离心 5min，弃上清；200μFACS 重悬细胞，1500rpm 离心 5min，弃上清；重复该步骤后 600μLFACS 重悬细胞；

(5) 染死活：7-AAD 5μL/管，4°C 避光孵育 5min；

(6) 过 400 目筛，BD 流式细胞仪上机。

5.4 实验结果

5.4.1 IP-MS 筛选 NSP7 切割产物的互作蛋白

与 NSP7 组做比对，IP-MS 筛选切割条带的互作蛋白为 ALB、H2BC11、TUBA4A、ATP6V0C、TUBA1A、BANF1、H2AC8、MYH9；

A

B

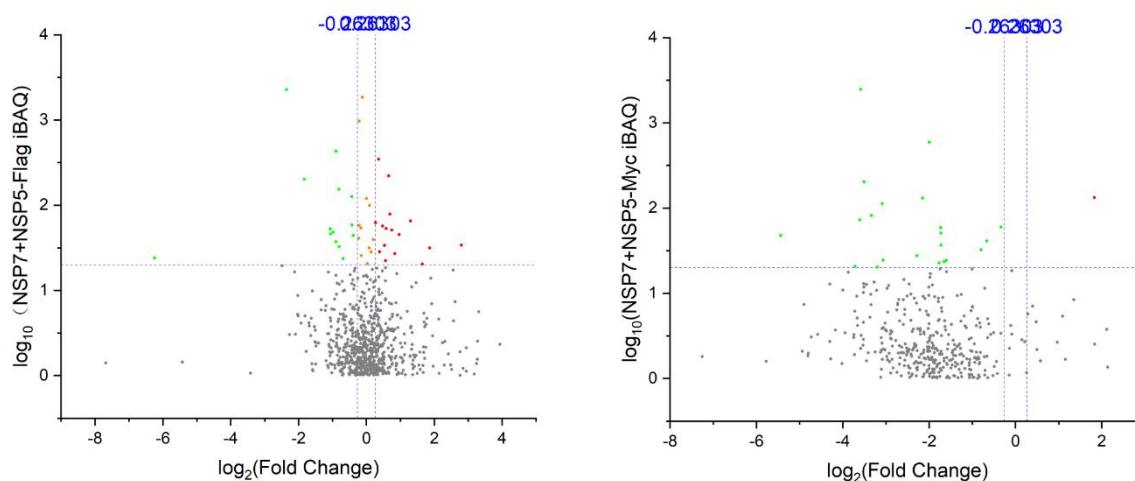


图 5.2 亲和纯化-质谱联用技术（IP-MS）筛选互作蛋白

Figure 5.2 The principle of affinity purification - mass spectrometry (IP-MS)

注：A 图为用 Flag 磁珠富集后质谱检测结果的火山图；A 图为用 Myc 磁珠富集后质谱检测结果的火山图；横坐标为 NSP5+NSP7 与 NSP7 iBAQ 值的比值取 $\log_2$ 的值，纵坐标是 iBAQ 值含量取 $\log_{10}$ 。

5.4.2 互作蛋白载体构建

（1）目的基因扩增

候选的 7 个基因，包括 *ALB*、*H2BC11*、*TUBA4A*、*ATP6V0C*、*TUBA1A*、*BANF1*、*H2AC8*。PCR 扩增 *ALB*、*H2BC11*、*TUBA4A*、*ATP6V0C*、*TUBA1A*、*BANF1* 和 *H2AC8* 的全基因序列，*ALB* 的并未扩增成功。

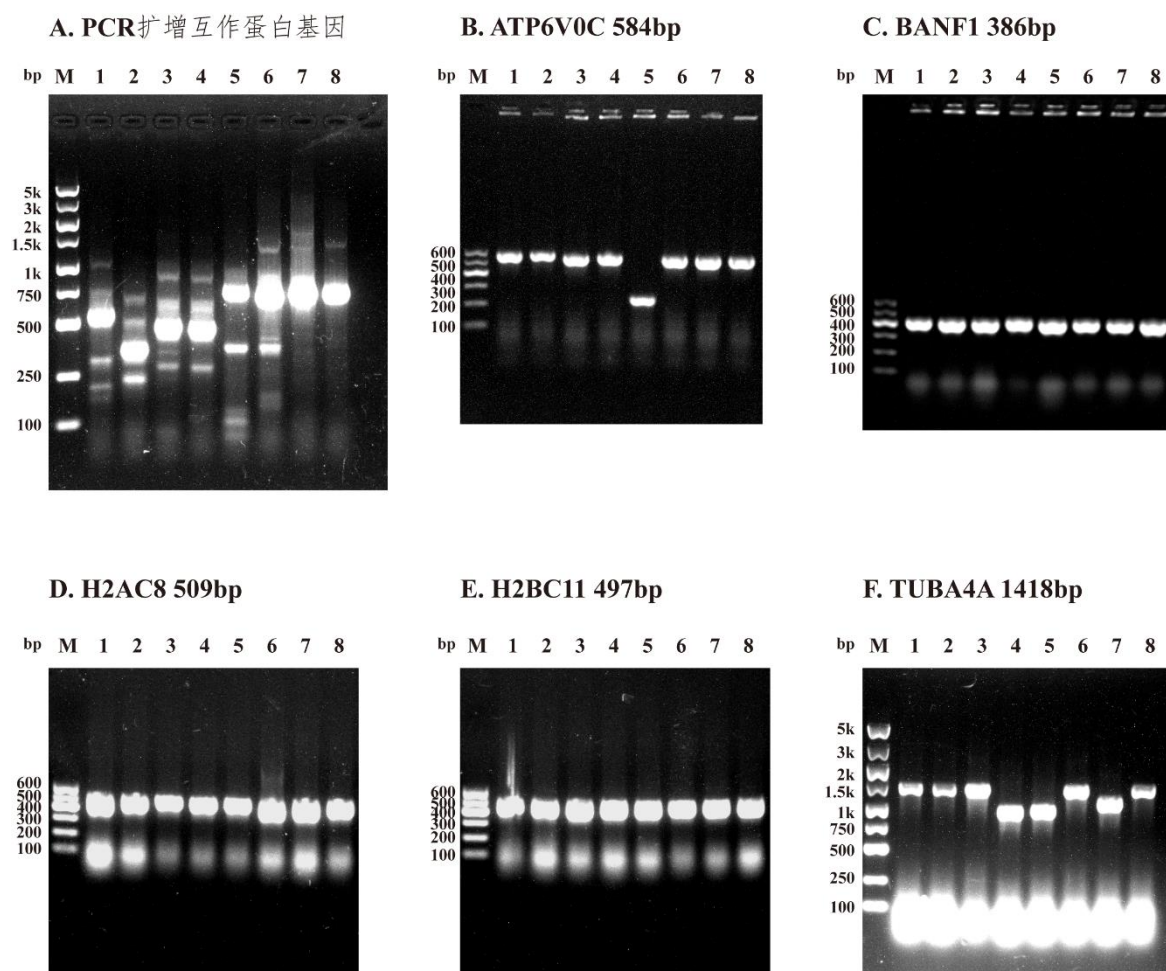


图 5.3 互作蛋白目的片段扩增及菌液 PCR

Tab.5.3 Amplification of target fragments of interacting proteins and bacterial liquid PCR

注：A：为扩增互作蛋白基因结果，从 1 至 8 分别为 ATP6V0C (543bp)、BANF1 (345bp)、H2AC8 (468bp)、H2BC11 (456bp)、TUBA1A-1 (744bp)、TUBA1A-2 (725bp)、TUBA4A-1 (744bp)、TUBA4A-2 (716bp)；其中 TUBA1A 和 TUBA4A 都分为了 2 个片段扩增，最后通过无缝克隆连接；B-E 分别为构建 ATP6V0C、BANF1、H2AC8、H2BC11、TUBA1A、TUBA4A 载体时挑取平板上 8 个单克隆进行菌液 PCR 的结果；

(2) 测序：挑取 8 个单克隆过夜摇菌，菌液 PCR 后送测。结果 ATP6V0C、BANF1、H2AC8、H2BC11、TUBA4A 测序成功。

5.4.3 Co-IP 验证 NSP7 切割片段与互作蛋白互作

构建成功 ATP6V0C、BANF1、H2AC8、H2BC11、TUBA4A 这五种质粒。设置对照有 p3.1、NSP7、NSP7+NSP5、互作蛋白、NSP7+互作蛋白，实验组为 NSP7+NSP5+互作蛋白，如图 5.4，结果表明 H2BC11、TUBA4A 在含有切割片段

的样中存在，但其与 S2 NSP7 也结合，可能是 NSP7 与切割片段的共有序列的作用。综上，IP-MS 联合 Co-IP 未检测到 NSP7 切割片段的特异性互作蛋白。

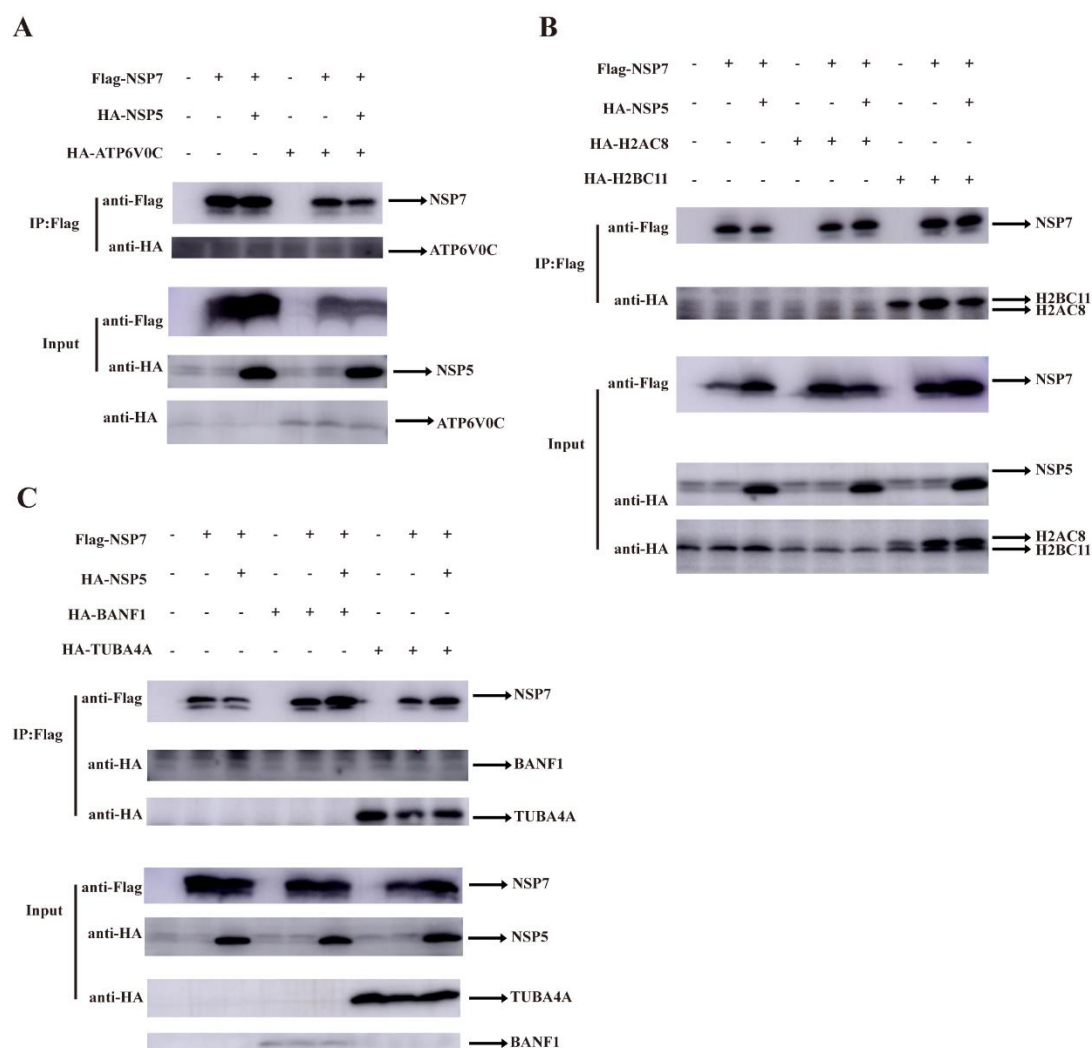


图 5.4 S2 NSP7 切割片段互作蛋白的验证

Figure 5.4 The validation of S2 NSP7 cleavage fragment interaction proteins

A: Co-IP 验证 S2 NSP7 切割片段 ATP6V0C 的互作; B: Co-IP 验证 S2 NSP7 切割片段 H2AC8 的互作; C: Co-IP 验证 S2 NSP7 切割片段 BANF1 的互作。

5.4.4 新型冠状病毒 NSP7 及其切割产物对 T 细胞活性的影响

本实验共设计 8 组，分别为阴性对照组，阳性对照组，NSP7（3kd 内管），NSP5（3kd 内管），NSP5+NSP7（3kd 内管），NSP7（3kd 外管），NSP5（3kd 内管），NSP5+NSP7（3kd 内管），将实验组分为两大组 3kDa 内管组和 3kDa 外管组。实验组所用蛋白样均为原核表达纯化得到的新冠病毒纯蛋白，由于新冠病毒 NSP5

并不会将 NSP7 完全切割，因此样品中存在完整的 NSP7。为获得 NSP7 切割产物，采用超滤管（3kDa）将 NSP7 切割产物超滤至外管后用于 T 细胞实验。如图 5.5 所示，阳性对照的 FITC-CD69 为 44%，NSP7 处理后为 37.9%，NSP7 切割产物处理后 31.6%；与阳性对照相比，对于 3kDa 的内管收集的样，NSP7 处理后的 T 细胞激活状态受到抑制，这与 S. M. Shahjahan Miah, Sandra Lelias 等研究 SARS-CoV-2 NSP7-289 抑制 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞记忆反应的结果一致^[84]。而 NSP5 和 NSP7+NSP5 组并没有受到抑制，表明 NSP5 并不会抑制 T 细胞激活。在第 3 章中结果表明，尿素胶检测 S2 NSP5 切割 S2 NSP7 后产生的切割条带大小为 6.5kD，WB 检测到剩余的肽段大小 3.3kD 左右，因此有一部分肽段漏到 3kDa 超滤管的外管。NSP5 对于 NSP7 的切割会减少 NSP7 的量而使得抑制效果减少。对于 3kDa 外管组，与 NSP7 相比，NSP7 切割产物的抑制效果更强，这与预期一致，NSP7 切割下的条带可能对 T 细胞活性的抑制效果更强。

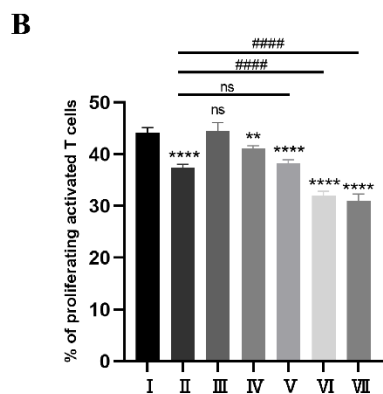
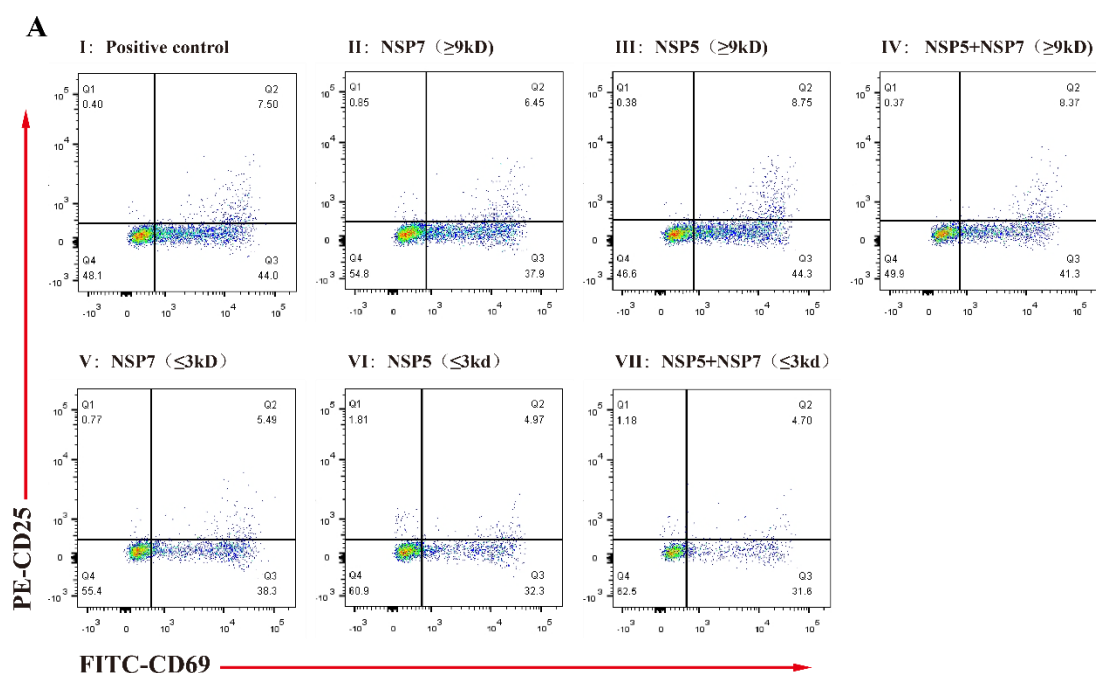


图 5.5 NSP5 切割 NSP7 对 T 细胞活性的影响

Figure 5.5 The effects of T cell activity on SARS-CoV-2 NSP5 mediated NSP7 cleavage

注：A：SARS-CoV-2 NSP7 切割产物对 T 细胞活性影响的散点图，所用 NSP7 和 NSP5 的样品为原核表达纯化所得产物；B：FITC-CD69 的百分比所作的直方图：I 为 CD3+CD28 阳性对照；II 为 3kd 超滤管过滤 NSP7 后的内管；III 为 3kd 超滤管过滤 NSP5 后的内管；IV 为 3kd 超滤管过滤 NSP5+NSP7 后的内管；V 为 3kd 超滤管过滤 NSP7 后的外管；VI 为 3kd 超滤管过滤 NSP5 后的外管；VII 为 3kd 超滤管过滤 NSP5+NSP7 后的内管；“*” 为与阳性对照（I）比较，“#” 为与 NSP7（II）比较。

5.5 讨论与小结

在发现 NSP7 被 NSP5 切割形成的切割产物基础上，本课题进一步研究 S2 NSP7 切割产物的亚细胞定位和功能。结果显示 NSP7 主要定位于细胞质，部分定位于细胞膜，在 NSP5 切割后形成的切割产物定位于细胞核。切割后 NSP7 的定位发生变化表明切割会影响 NSP7 的亚细胞定位，可能原因是切割产生的 NSP7 切割片段与 NSP7 有不同的定位，这可能赋予 NSP7 切割产物区别于 NSP7 的功能。接着研究了切割对 NSP7 的宿主互作蛋白及对宿主细胞的影响。IP-MS 筛选 NSP7 切割片段的互作蛋白为 ALB、H2BC11、TUBA4A、ATP6V0C、TUBA1A、BANF1、H2AC8，Co-IP 验证显示这些互作蛋白大部分也与 NSP7 互作，并不只与 NSP7 切割产物互作。基于 S2 NSP7 存在于细胞膜上，进行 T 细胞激活实验，NSP7 切割产物可能对 T 细胞活性的抑制效果更强。

6 总结与展望

新冠肺炎的重症患者会迅速发展为 ARDS、急性呼吸衰竭和死亡^[58]。现有的资料表明，宿主免疫功能在控制新冠病毒感染中扮演重要的角色，其详细机制尚未完全阐明。大约 85%左右的患者可以自然痊愈，而免疫功能的差异在轻症患者与重症患者之间起到非常重要的作用^[59]。

先天免疫系统对 COVID-19 的发展至关重要，炎症未得到解决会导致细胞因子风暴，这与 COVID-19 的严重程度和临床结果密切相关。研究表明新冠病毒蛋白与细胞炎症和先天性免疫应答有关。新冠病毒多个非结构蛋白靶向线粒体抗病毒信号蛋白(MAVS)通路^[106]，表明 SARS-CoV-2 利用病毒蛋白抑制宿主的抗病毒免疫。COVID-19 的严重程度与细胞因子风暴高度相关，而 SARS-CoV-2 NSP7 通过靶向 RIG-I/MDA5、TRIF 和 STING 抑制 IFN 应答^[82]，提示 NSP7 可能通过干扰 IFN 通路参与细胞因子风暴。已有研究利用质谱法鉴定出与新冠病毒蛋白结合的人类蛋白，其中 NSP7 的互作蛋白与囊泡运输、信号转导和电子传递有关^[81]，这也表明 NSP7 的功能不只是 NSP12 的辅助因子，其功能还有研究空间。

本课题组前期已经证实位于多聚蛋白末端的 NSP10-11 间识别位点可能存在不完全切割，从而产生 NSP10-11 二聚体^[93]，而 NSP10-11 的不完全切割是由 NSP5 介导的。NSP5 特异性识别序列的两个关键性位点分别为 P1 (Gln) 和 P2(Leu、Pro 或 Val)，根据 NSP5 的特异性识别序列推测 NSP7 可能存在两个切割位点 Q18 和 Q34。本课题前期根据 7 种不同致病性的冠状病毒比较 SARS-CoV-2 NSP5 在 NSP7 上的两个预测切割位点，发现 NSP7 同时存在 Q18、Q34 这两个酶切位点可能与冠状病毒的强致病性相关。据此比较做出假设，在新冠病毒入侵宿主细胞后，可能 NSP5 会在 Q18 和 Q34 处切割 NSP7 产生 NSP7 切割产物，该切割产物为 NSP7 的非经典形式，可能对宿主细胞有不同于 NSP7 的新作用，对新冠病毒致病机制的研究提供了新角度。

本研究中我们选择 NSP5 的抑制剂和 NSP5 活性突变体探究 SARS-CoV-2 NSP7 的切割是否与 NSP5 有关。在初步发现 NSP7 同时存在两个酶切位点可能与冠状病毒的强致病性相关的基础上，探究 NSP7 是否被 NSP5 切割。由于 NSP7 的相对分子质量较小，因此构建带 GFP 标签的 NSP7 载体，检测到预测切割条带的同时发现不加 NSP5 时也存在该条带，可能是由于细胞内的宿主蛋白酶的作用。当用

GC376 处理后, NSP5 对 NSP7 切割不呈现递减趋势, 说明 NSP7 主带的递减趋势可能有 NSP5 的参与; 抑制蛋白酶活性的方式除了使用蛋白酶抑制剂外, 还可以通过将活性位点突变使酶失活。NSP5 发挥功能的区域为一个由 5 个 α -螺旋组成的域 III, 其中残基 Cys145 和 His41 位于活性位点的空腔中^[90]。因此将 C145 位点突变成 A, 获得 NSP5 C145A 突变体。本实验中通过同源重组技术构建了 NSP5 C145A 突变体用于验证在宿主细胞中 NSP5 是否切割 NSP7, 结果表明当将 C145 位点突变后, 在 NSP5 失活情况下, NSP7 不会被切割, 从侧面验证在细胞中随 NSP5 量的增加 NSP7 主带的量的递减趋势确实有 NSP5 参与。

真实的细胞活动相当复杂, 蛋白的水解可能还有其它因素的参与, 比如细胞内的蛋白酶体降解途径, 主要有泛素-蛋白酶体降解途径, caspase 蛋白降解途径和溶酶体降解途径^[97-98]。使用 MG132、Z-VAD(OMe)-FMK 和 Bafilomycin-A1 针对这三个蛋白降解途径的抑制剂, 排除细胞内蛋白降解途径的影响。结果表明自噬-溶酶体途径可能影响 NSP5 对 NSP7 的切割, 在自噬过程中, 囊泡(或吞噬泡)包裹细胞质成分并形成双膜自噬体, 随后与溶酶体融合进行蛋白水解。这与已有文献筛选到的 NSP7 互作蛋白相关功能一致, 有与囊泡运输相关的蛋白与 NSP7 互作, 但自噬-溶酶体途径如何影响 NSP5 对 NSP7 的切割过程仍有待研究。

前期研究发现带 GFP 的 S2 NSP7 被 S2 NSP5 切割的趋势不明显, 可能是 GFP 的存在影响了 S2 NSP7 的构像进而影响了 S2 NSP5 对 S2 NSP7 的作用, 因此后续实验中使用质粒将 GFP 去掉。在目标蛋白分子质量较小的情况下, 为寻找切割条带, 明确切割分子机制, 将 NSP5 在 NSP7 上的预测切割位点突变, 当不存在主带的递减趋势时即可表明该位点为 NSP5 的目标位点。首先先将 Q18 和 Q34 两个切割位点突变, 结果未能如预期一样, 切割趋势消失。后续接着将所有 Q 位点全部突变仍未发现主带的递减趋势消失, 对实验造成较大困扰。通过查找文献发现 EAV(动脉炎病毒) NSP4 与新冠病毒 NSP5 有一定的相似性, S2 NSP5 也能与 EAV NSP4 一样识别 P1 位的 E^[90], 因此构建 NSP7 所有 E 和 Q 的突变体, 与预期一致, NSP5 无法对 NSP7(EQmu)进行切割, 说明 NSP5 在 NSP7 上的切割位点确实为 Q 或 E。

本课题遇到较大困难是切割条带很小且量较少常规方法检测不到, 因此通过原核表达纯化制作 S2 NSP5 和 S2 NSP7 的纯蛋白样, 在符合 NSP5 活性的条件下进行酶切反应产生的切割产物的量会比在细胞中多, 结果和预期一致, 得到 NSP7

的切割产物，且随着 NSP5 量的增加，切割条带的量逐渐增加。仅仅检测到切割条带位置并无法明确切割位点，还需由 N 端带的 myc 标签和 C 端带的 flag 标签明确检测到的切割条带处于哪一端。有趣的是，Flag 端并未检测到 6.5kd 大小处的切割条带，而 Myc 抗体检测到 2 个切割产物，大小约在 6.5kD 处和 3.3kD 处。6.5kD 处与尿素胶上检测到的切割条带一致，此切割位点是 47TE (7.04kD)；根据蛋白相对分子质量分析 3.3kD 附近的切割位点可能是 18LQ (3.73kD)、19QQ (3.86kD) 或者 23VE (4.36kD)。本文部分揭示了 S2 NSP5 作用于 S2 NSP7 的分子机制。NSP5 在 NSP7 上至少存在三个切割位点产生 4 个切割产物，第一个切割位点可能是 18Q、19Q 和 23E，第二个切割位点是 47E，第三个切割位点可能是 73E 或者 74E。细胞中检测到 Q18 位点切割下的条带，这少于无细胞酶切中检测到的切割条带，在细胞中未检测到其他位点产生的条带可能原因是在细胞中产生的切割条带量较少，这还需要进一步的研究。我们的研究首次初步发现 SARS-CoV-2 NSP5 切割 NSP7，且检测到切割条带，创新性的发现了 NSP7 的非经典形式，为 NSP7 的功能研究提供了新思路。NSP5 对 NSP7 的切割产物是否对 S2NSP7 原有的功能有影响尚待研究。

新冠病毒基因组编码大约 29 个蛋白，该研究利用免疫荧光等方法系统的阐明了除 NSP11 蛋白之外（仅有 14 个氨基酸）的 28 个新冠病毒蛋白的亚细胞定位^[107]。大部分新冠病毒蛋白定位在细胞质中，一些新冠病毒蛋白同时具有细胞质和细胞核定位，4 个新冠病毒蛋白 M、NSP15、ORF6、ORF7a 检测到在高尔基体上，ORF3a 定位在内体和溶酶体中，NSP6、ORF7b、ORF8 和 ORF10 定位在内质网中^[107]。ORF3a 与内体蛋白 Rab5、循环利用内体蛋白 Rab11、参与早期内体向晚期内体转运的蛋白 Rab7 以及溶酶体蛋白 Lamp1 存在共定位，这表明 ORF3a 参与了最终引起内体和溶酶体融合的内吞过程，因此，ORF3a 有可能参与了细胞内有毒物质的自我清除并且促进 SARS-CoV-2 复制^[107]。这些都提示蛋白的亚细胞定位对理解新冠病毒与宿主细胞的相互作用具有重要启发作用，本文中发现自噬-溶酶体蛋白降解途径可能影响 NSP5 对 NSP7 的切割，后续研究将从切割片段与自噬-溶酶体途径相关蛋白共定位的角度分析这一过程的分子机制。

本课题通过 IP-MS 研究 S2 NSP7 与 S2 NSP7 切割产物功能的差异，比较 NSP7 与 NSP7 切割产物的互作蛋白差异表达基因进一步研究切割对 NSP7 功能的影响。IP-MS 筛选切割条带的互作蛋白为 ALB、H2BC11、TUBA4A、ATP6V0C、TUBA1A、BANF1、H2AC8、MYH9；Co-IP 验证发现 H2BC11 和 TUBA4A 与

NSP7 结合,可能与 NSP7 切割也结合。这并不难理解,因为 NSP7 与 NSP7 切割产物有相同的部分。TUBA4A 是微管蛋白,由 α 和 β 微管蛋白的异二聚体组成, H2BC11 是基本的核蛋白,负责真核生物染色体纤维的核小体结构。筛选到的这些互作蛋白并不是只与 NSP7 切割片段特异性结合,无法根据互作蛋白研究 NSP7 切割片段的新功能。但在第四章中共定位检测到 S2 NSP7 的切割片段可能定位于细胞核,切割片段可能与 H2BC11 在细胞核中相互作用影响细胞的某些功能。

许多人类病原体含有 Tregitopes。Tregitopes 的存在可能使病毒减少对病毒抗原的免疫反应,即免疫伪装。免疫伪装是指存在类似人类的耐受表位,这些表位可能被病原体整合到关键抗原中,使病原体能够逃避免疫攻击^[84]。免疫伪装可以帮助病毒避开自然免疫防御,在病毒表位被 Treg 识别的情况下,它也可能抑制免疫反应^[84]。本课题研究了 NSP7 及其切割产物的亚细胞定位。新冠病毒蛋白 NSP7 定位于细胞质,NSP5 使 NSP7 定位发生变化,进一步说明 NSP5 切割 NSP7,且发现 NSP7 切割产物有一部分定位于细胞膜,这与 S2 NSP7 对于 T 细胞活性的影响可能有关。有研究证实 NSP7-289 强烈抑制 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞记忆反应,对多个 II 类 HLA-DR 等位基因具有低至高亲和力^[84]。与 289z tregiope 相似,NSP7-289 可能影响很大一部分人体内对 SARS-CoV-2 的免疫反应。NSP7-289 似乎具有与已知 Tregitopes 289 和 289z 相似的免疫调节特性^[84]。本课题中发现 S2 NSP7 切割产物的抑制效果更强,可能是由于切割使 NSP7 发挥功能的表位凸显因而增强了抑制 T 细胞活性的功能。

本课题在 NSP5 对新冠病毒多聚蛋白切割产生 NSP7 基础上进一步对 NSP7 内部切割,创新性发现病毒蛋白非经典形式,加深病毒与宿主互作的认识。

6.1 主要结论

(1) 证实 NSP5 切割 NSP7,并且切割过程可能受到自噬-溶酶体蛋白降解途径的影响;

(2) 新冠病毒 NSP5 在 NSP7 上至少存在三个切割位点产生 4 个切割产物,切割位点可能是 Q18、Q19、E23、E47、E73 和 E74;

(3) 新冠病毒 NSP7 主要定位于细胞质,部分定位于细胞膜,NSP7 切割产物可能定位于细胞核;

(4) IP-MS 筛选新冠病毒 NSP7 切割片段的互作蛋白为 ALB、H2BC11、TUBA4A、

ATP6V0C、TUBA1A、BANF1、H2AC8、MYH9；H2AC8、H2BC11、TUBA4A 与 NSP7 切割片段结合，但其与 NSP7 也结合；

（5）NSP7 抑制 T 细胞活性，NSP7 切割产物进一步抑制 T 细胞活性；

6.2 展望

本课题基于新冠病毒 NSP5 可以切割 NSP7 的前期发现，致力于研究新冠病毒 NSP5 切割对 NSP7 与宿主互作的影响，揭示新冠 NSP7 的非经典形式及其对病毒宿主互作的影响。在发现 NSP7 切割产物后，后续将进一步证明不确定的切割位点，揭示 NSP5 切割 NSP7 的分子机制，用 NSP7 切割片段研究其在宿主细胞中的功能。为新冠病毒致病机制的研究提供新视角。

参考文献

- [1] Brian DA, Baric RS. Coronavirus genome structure and replication[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005, 287:1-30.
- [2] Snijder EJ, Decroly E, Ziebuhr J. The Nonstructural proteins directing coronavirus RNA synthesis and processing[J]. *Adv Virus Res*, 2016, 96:59-126.
- [3] Brant AC, Tian W, Majerciak V, *et al.* SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication[J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1):136.
- [4] Gorbalenya AE, Enjuanes L, Ziebuhr J, *et al.* Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome[J]. *Virus Res*. 2006, 117(1):17-37.
- [5] Thiel V, Herold J, Schelle B, *et al.* Viral replicase gene products suffice for coronavirus discontinuous transcription[J]. *J Virol*, 2001, 75(14):6676-81.
- [6] Ziebuhr J. The coronavirus replicase[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005, 287:57-94.
- [7] Kelly JA, Woodside MT, Dinman JD. Programmed -1 ribosomal frameshifting in coronaviruses: A therapeutic target[J]. *Virology*, 2021, 554:75-82.
- [8] 朱婷, 洪润婧, 徐雅雯, 等. 猪流行性腹泻病毒 nsp8 蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备[J]. *中国兽医科学*, 2023, 53(10):1279-1284.
- [9] Zhou Y, Su JM, Samuel CE, *et al.* Measles virus forms inclusion bodies with properties of liquid organelles[J]. *J Virol*, 2019, 93(21):e00948-19.
- [10] Galloux M, Risso-Ballester J, Richard CA, *et al.* Minimal elements required for the formation of respiratory syncytial virus cytoplasmic inclusion bodies in vivo and in vitro. *mBio*[J]. 2020, 11(5):e01202-20.
- [11] Lei J, Kusov Y, Hilgenfeld R. Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein[J]. *Antiviral Res*, 2018, 149:58-74.
- [12] Brian DA, Baric RS. Coronavirus genome structure and replication[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005, 287:1-30.
- [13] Yan R, Zhang Y, Li Y, *et al.* Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2[J]. *Science*, 2020, 367(6485):1444-1448.
- [14] Lee J, Kenward C, Worrall LJ, *et al.* X-ray crystallographic characterization of the

- SARS-CoV-2 main protease polyprotein cleavage sites essential for viral processing and maturation[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):5196.
- [15] Narwal M, Armache JP, Edwards TJ, *et al*. SARS-CoV-2 polyprotein substrate regulates the stepwise M^{pro} cleavage reaction[J]. *J Biol Chem*, 2023, 299(5):104697.
- [16] Wang MY, Zhao R, Gao LJ, *et al*. SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10:587269.
- [17] Candido KL, Eich CR, de Fariña LO, *et al*. Spike protein of SARS-CoV-2 variants: a brief review and practical implications[J]. *Braz J Microbiol*, 2022, 53(3):1133-1157.
- [18] Bai Z, Cao Y, Liu W, *et al*. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its role in viral structure, biological functions, and a potential target for drug or vaccine mitigation[J]. *Viruses*, 2021, 13(6):1115.
- [19] 刘晓炫.利用家蚕生产一种表达 COVID-19 抗原（RBD 蛋白）的嗜呼吸道重组腺相关病毒载体[D].江苏大学, 2022.
- [20] Lamkiewicz K, Esquivel Gomez LR, Kühnert D, *et al*. Genome structure, life cycle, and taxonomy of coronaviruses and the evolution of SARS-CoV-2[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2023, 439:305-339.
- [21] Gorbalenya AE, Enjuanes L, Ziebuhr J, *et al*. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome[J]. *Virus Res*, 2006, 117(1):17-37.
- [22] Woo PC, Lau SK, Lam CS, *et al*. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus[J]. *J Virol*, 2012, 86(7):3995-4008.
- [23] Ravelomanantsoa NAF, Guth S, Andrianiana A, *et al*. The zoonotic potential of bat-borne coronaviruses[J]. *Emerg Top Life Sci*, 2020, 4(4):353-369.
- [24] 楚侃侃, 郭玲, 陈利, 等. 冠状病毒分类、宿主动物与所致人类疾病研究进展[J]. *中国公共卫生*, 2022, 38(06):815-820.
- [25] Zhou P, Yang XL, Wang XG, *et al*. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. *Nature*, 2020 Mar, 579(7798):270-273.
- [26] Banerjee A, Doxey AC, Mossman K, *et al*. Unraveling the zoonotic origin and

- p>transmission of SARS-CoV-2[J]. Trends Ecol Evol, 2021, 36(3):180-184.
- [27] Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses[J]. Nat Rev Microbiol[J]. 2019, 17(3):181-192.
- [28] Paules CI, Marston HD, Fauci AS. Coronavirus infections-more than Just the common cold[J]. JAMA, 2020, 323(8):707-708.
- [29] Rodriguez-Morales AJ, Bonilla-Aldana DK, Balbin-Ramon GJ, *et al.* History is repeating itself: probable zoonotic spillover as the cause of the 2019 novel coronavirus epidemic[J]. Infez Med, 2020, 28(1):3-5.
- [30] Guan Y, Zheng BJ, He YQ, *et al.* Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China[J]. Science. 2003, 302(5643):276-8.
- [31] Sharif-Yakan A, Kanj SS. Emergence of MERS-CoV in the Middle East: origins, transmission, treatment, and perspectives[J]. PLoS Pathog, 2014, 10(12):e1004457.
- [32] Hu B, Guo H, Zhou P, *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19[J]. Nat Rev Microbiol, 2021, 19(3):141-154.
- [33] Ma LL, Liu HM, Liu XM, *et al.* Screening S protein - ACE2 blockers from natural products: Strategies and advances in the discovery of potential inhibitors of COVID-19[J]. Eur J Med Chem, 2021, 226:113857.
- [34] Jackson CB, Farzan M, Chen B, *et al.* Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022, 23(1):3-20.
- [35] Ashraf UM, Abokor AA, Edwards JM, *et al.* SARS-CoV-2, ACE2 expression, and systemic organ invasion[J]. Physiol Genomics, 2021, 53(2):51-60.
- [36] Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, *et al.* Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis[J]. J Pathol, 2004, 203(2):631-7.
- [37] Li Y, Zhou W, Yang L, *et al.* Physiological and pathological regulation of ACE2, the SARS-CoV-2 receptor[J]. Pharmacol Res, 2020, 157:104833.
- [38] Brant AC, Tian W, Majerciak V, *et al.* SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication[J]. Cell Biosci, 2021, 11(1):136.
- [39] Wolff G, Melia CE, Snijder EJ, *et al.* Double-membrane vesicles as platforms for

- viral replication[J]. Trends Microbiol, 2020, 28(12):1022-1033.
- [40] Zhao Y, Zhu Y, Liu X, *et al.* Structural basis for replicase polyprotein cleavage and substrate specificity of main protease from SARS-CoV-2[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119(16):e2117142119.
- [41] Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, *et al.* The molecular virology of coronaviruses[J]. J Biol Chem, 2020, 295(37):12910-12934.
- [42] Kung YA, Lee KM, Chiang HJ, *et al.* Molecular virology of SARS-CoV-2 and related coronaviruses[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2022, 86(2):e0002621.
- [43] Klein S, Cortese M, Winter SL, *et al.* SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography[J]. Nat Commun, 2020, 11(1):5885.
- [44] Gusev E, Sarapultsev A, Solomatina L, *et al.* SARS-CoV-2-specific immune response and the pathogenesis of COVID-19[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3):1716.
- [45] Bakhshandeh B, Jahanafrooz Z, Abbasi A, *et al.* Mutations in SARS-CoV-2; consequences in structure, function, and pathogenicity of the virus[J]. Microb Pathog, 2021, 154:104831.
- [46] Iddir M, Brito A, Dingeo G, *et al.* Strengthening the immune system and reducing inflammation and oxidative stress through diet and nutrition: considerations during the COVID-19 Crisis[J]. Nutrients, 2020, 12(6):1562.
- [47] Dhama K, Khan S, Tiwari R, *et al.* Coronavirus disease 2019-COVID-19[J]. Clin Microbiol Rev, 2020, 33(4):e00028-20.
- [48] Guo YR, Cao QD, Hong ZS, *et al.* The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status[J]. Mil Med Res, 2020, 7(1):11.
- [49] Wu HY, Chang PH, Chen KY, *et al.* Coronavirus disease 2019 (COVID-19) associated bacterial coinfection: Incidence, diagnosis and treatment[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2022, 55(6 Pt 1):985-992.
- [50] Bourgonje AR, Abdulle AE, Timens W, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19) [J]. J Pathol, 2020, 251(3):228-248.
- [51] Shi Y, Wang G, Cai XP, *et al.* An overview of COVID-19[J]. J Zhejiang Univ Sci B,

- 2020, 21(5):343-360.
- [52] Seeßle J, Waterboer T, Hippchen T, *et al.* Persistent symptoms in adult patients 1 year after coronavirus disease 2019 (COVID-19): A prospective cohort study[J]. Clin Infect Dis, 2022, 74(7):1191-1198.
- [53] Shoaib MH, Ahmed FR, Sikandar M, *et al.* A Journey from SARS-CoV-2 to COVID-19 and beyond: A comprehensive insight of epidemiology, diagnosis, pathogenesis, and overview of the progress into its therapeutic management[J]. Front Pharmacol, 2021, 12:576448.
- [54] hen X, Liu S, Goraya MU, *et al.* Host immune response to influenza a virus infection[J]. Front Immunol, 2018, 9:320.
- [55] Malik G, Zhou Y. Innate Immune sensing of influenza a virus[J]. Viruses, 2020,12(7):755.
- [56] Onomoto K, Onoguchi K, Yoneyama M. Regulation of RIG-I-like receptor-mediated signaling: interaction between host and viral factors[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(3):539-555.
- [57] Renner K, Schwittay T, Chaabane S, *et al.* Severe T cell hyporeactivity in ventilated COVID-19 patients correlates with prolonged virus persistence and poor outcomes[J]. Nat Commun, 2021, 12(1):3006.
- [58] Ramasamy S, Subbian S. Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis[J]. Clin Microbiol Rev, 2021, 34(3):e00299-20.
- [59] Sposito B, Broggi A, Pandolfi L, *et al.* The interferon landscape along the respiratory tract impacts the severity of COVID-19[J]. Cell, 2021, 184(19):4953-4968.e16.
- [60] Zhao Y, Kilian C, Turner JE, *et al.* Clonal expansion and activation of tissue-resident memory-like Th17 cells expressing GM-CSF in the lungs of severe COVID-19 patients[J]. Sci Immunol, 2021, 6(56):eabf6692.
- [61] Zhang JY, Wang XM, Xing X, *et al.* Single-cell landscape of immunological responses in patients with COVID-19[J]. Nat Immunol, 2020, 21(9):1107-1118.
- [62] Sette A, Sidney J, Crotty S. T Cell Responses to SARS-CoV-2[J]. Annu Rev

- Immunol, 2023, 41:343-373.
- [63] 董慧君, 李彤, 庄辉, 等. 干扰素刺激基因与新型冠状病毒相互作用的研究进展[J].微生物学报, 2023, 63(04):1329-1339.
- [64] 海洋,谢建平. SARS-CoV-2 NSP7 和 NSP8 的研究进展[J].生物信息学, 2021, 19(03):149-158.
- [65] Peti W, Johnson MA, Herrmann T, *et al.* Structural genomics of the severe acute respiratory syndrome coronavirus: nuclear magnetic resonance structure of the protein nsP7[J]. J Virol, 2005, 79(20):12905-13.
- [66] Sarma H, Jamir E, Sastry GN. Protein-protein interaction of RdRp with its co-factor NSP8 and NSP7 to decipher the interface hotspot residues for drug targeting: A comparison between SARS-CoV-2 and SARS-CoV[J]. J Mol Struct, 2022, 1257:132602.
- [67] Tonelli M, Rienstra C, Anderson TK, *et al.* ^1H , ^{13}C , and ^{15}N backbone and side chain chemical shift assignments of the SARS-CoV-2 non-structural protein 7[J]. Biomol NMR Assign, 2021, 15(1):73-77.
- [68] Subissi L, Posthuma CC, Collet A, *et al.* One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(37):E3900-9.
- [69] Wilamowski M, Hammel M, Leite W, *et al.* Transient and stabilized complexes of Nsp7, Nsp8, and Nsp12 in SARS-CoV-2 replication[J]. Biophys J, 2021, 120(15):3152-3165.
- [70] Kirchdoerfer RN, Ward AB. Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors[J]. Nat Commun, 2019, 10(1):2342.
- [71] Gao Y, Yan L, Huang Y, Liu F, *et al.* Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus[J]. Science, 2020, 368(6492):779-782.
- [72] Wang Q, Wu J, Wang H, *et al.* Structural basis for RNA replication by the SARS-CoV-2 polymerase[J]. Cell, 2020, 182(2):417-428.
- [73] Zhang C, Li L, He J, *et al.* Nonstructural protein 7 and 8 complexes of SARS-CoV-2[J]. Protein Sci, 2021, 30(4):873-881.
- [74] Xiao Y, Ma Q, Restle T, *et al.* Nonstructural proteins 7 and 8 of feline coronavirus form a 2:1 heterotrimer that exhibits primer-independent RNA polymerase activity[J].

- J Virol, 2012, 86(8):4444-54.
- [75] Zhai Y, Sun F, Li X, *et al.* Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7-nsp8 hexadecamer[J]. Nat Struct Mol Biol, 2005, 12(11):980-6.
- [76] te Velthuis AJ, van den Worm SH, Snijder EJ. The SARS-coronavirus nsp7+nsp8 complex is a unique multimeric RNA polymerase capable of both de novo initiation and primer extension[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(4):1737-47.
- [77] Peng Q, Peng R, Yuan B, *et al.* Structural and biochemical characterization of the nsp12-nsp7-nsp8 core polymerase complex from SARS-CoV-2[J]. Cell Rep, 2020, 31(11):107774.
- [78] 雷清.新型冠状病毒肺炎患者体液免疫应答规律及其应用[D].华中科技大学, 2021.
- [79] Archer SL, Dasgupta A, Chen KH, *et al.* SARS-CoV-2 mitochondriopathy in COVID-19 pneumonia exacerbates hypoxemia[J]. Redox Biol, 2022, 58:102508.
- [80] Gordon DE, Hiatt J, Bouhaddou M, *et al.* Comparative host-coronavirus protein interaction networks reveal pan-viral disease mechanisms[J]. Science, 2020, 370(6521):eabe9403.
- [81] Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, *et al.* A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing[J]. Nature, 2020, 583(7816):459-468.
- [82] Deng J, Zheng Y, Zheng SN, *et al.* SARS-CoV-2 NSP7 inhibits type I and III IFN production by targeting the RIG-I/MDA5, TRIF, and STING signaling pathways[J]. J Med Virol, 2023, 95(3):e28561.
- [83] Garmay Y, Rubel A, Egorov V. Peptide from NSP7 is able to form amyloid-like fibrils: Artifact or challenge to drug design[J]? Biochim Biophys Acta Proteins Proteom, 2023, 1871(2):140884.
- [84] Miah SMS, Lelias S, Gutierrez AH, *et al.* A SARS-CoV-2 NSP7 homolog of a Treg epitope suppresses CD4⁺ and CD8⁺ T cell memory responses[J]. Front Immunol, 2023, 14:1290688.
- [85] Jin Z, Du X, Xu Y, *et al.* Structure of M^{pro} from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors[J]. Nature, 2020, 582(7811):289-293.

- [86] Zhang L, Lin D, Sun X, *et al.* Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors[J]. *Science*, 2020, 368(6489):409-412.
- [87] Zhang S, Wang J, Cheng G. Protease cleavage of RNF20 facilitates coronavirus replication via stabilization of SREBP1[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(37):e2107108118.
- [88] Muramatsu T, Takemoto C, Kim YT, *et al.* SARS-CoV 3CL protease cleaves its C-terminal autoprocessing site by novel subsite cooperativity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(46):12997-13002.
- [89] Chen J, Li Z, Guo J, *et al.* SARS-CoV-2 nsp5 Exhibits Stronger Catalytic Activity and Interferon Antagonism than Its SARS-CoV Ortholog[J]. *J Virol*, 2022, 96(8):e0003722.
- [90] 陈霁瑶. 动脉炎病毒和冠状病毒 3C 样蛋白酶切割 NEMO 的分子机制[D]. 华中农业大学, 2021.
- [91] Pablos I, Machado Y, de Jesus HCR, *et al.* Mechanistic insights into COVID-19 by global analysis of the SARS-CoV-2 3CL^{pro} substrate degradome[J]. *Cell Rep*, 2021, 37(4):109892.
- [92] Krichel B, Falke S, Hilgenfeld R, *et al.* Processing of the SARS-CoV pp1a/ab nsp7-10 region[J]. *Biochem J*. 2020 Mar 13;477(5):1009-1019.
- [93] 高泽峰. 新冠病毒非结构蛋白 NSP10-11 的发现及其与宿主互作初步研究[D]. 山西大学, 2023.
- [94] Vuong W, Fischer C, Khan MB, *et al.* Improved SARS-CoV-2 Mpro inhibitors based on feline antiviral drug GC376: Structural enhancements, increased solubility, and micellar studies[J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 222:113584.
- [95] van Aken D, Zevenhoven-Dobbe J, Gorbalenya AE, *et al.* Proteolytic maturation of replicase polyprotein pp1a by the nsp4 main proteinase is essential for equine arteritis virus replication and includes internal cleavage of nsp7[J]. *J Gen Virol*, 2006, 87(Pt 12):3473-3482.
- [96] Matsuoka K, Imahashi N, Ohno M, *et al.* SARS-CoV-2 accessory protein ORF8 is secreted extracellularly as a glycoprotein homodimer[J]. *J Biol Chem*, 2022, 298(3):101724.

- [97] 陈洪志. 核糖体大亚基蛋白 3 的降解途径研究[D]. 吉林大学, 2020.
- [98] Green DR. Caspase Activation and Inhibition[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2022, 14(8):a041020.
- [99] Guo N, Peng Z. MG132, a proteasome inhibitor, induces apoptosis in tumor cells[J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2013, 9(1):6-11.
- [100] Kim MS, Lee JA, Kim KH. Effects of a broad-spectrum caspase inhibitor, Z-VAD(OMe)-FMK, on viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection-mediated apoptosis and viral replication[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 51:41-45.
- [101] Zhang C, Wei B, Liu Z, *et al.* Bafilomycin A1 inhibits SARS-CoV-2 infection in a human lung xenograft mouse model[J]. *Virol J*, 2023, 20(1):18.
- [102] Reshamwala SMS, Likhite V, Degani MS, *et al.* Mutations in SARS-CoV-2 nsp7 and nsp8 proteins and their predicted impact on replication/transcription complex structure[J]. *J Med Virol*, 2021, 93(7):4616-4619.
- [103] Courouble VV, Dey SK, Yadav R, *et al.* Revealing the structural plasticity of SARS-CoV-2 nsp7 and nsp8 using structural proteomics[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2021, 32(7):1618-1630.
- [104] 覃秋红, 张瑶尧, 潘剑, 等. 抗 CD3/CD28 单克隆抗体联合 PHA 对 T 淋巴细胞活化和增殖的影响[J]. *微生物学免疫学进展*, 2020, 48(02):16-21.
- [105] Trickett A, Kwan YL. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads[J]. *J Immunol Methods*, 2003, 275(1-2):251-5.
- [106] Archer SL, Dasgupta A, Chen KH, *et al.* SARS-CoV-2 mitochondriopathy in COVID-19 pneumonia exacerbates hypoxemia[J]. *Redox Biol*, 2022, 58:102508.
- [107] Zhang J, Cruz-Cosme R, Zhuang MW, *et al.* A systemic and molecular study of subcellular localization of SARS-CoV-2 proteins[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1):269.
- [108] Ju X, Wang Z, Wang P, *et al.* SARS-CoV-2 main protease cleaves MAGED2 to antagonize host antiviral defense[J]. *mBio*, 2023, 14(4):e0137323.