



山西大学
SHANXI UNIVERSITY

2024 届硕士学位论文

新冠病毒 NSP5 切割对 ORF7a 与宿主互 作的影响研究

作者姓名	成瑞玲
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 ORF7a 与宿主互 作的影响研究

作者姓名	成瑞玲
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 Mniversity, 2024

A study on effect of SARS-CoV-2 NSP5 cleavage on
ORF7a interacts with host

Student Name	Rui-ling Cheng
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

新型冠状病毒（SARS-CoV-2）为高致病性人冠状病毒，其在人类和各物种之间的传播对全球的卫生健康和经济均造成了巨大的影响。NSP5 是病毒的主要蛋白酶，不仅切割病毒多聚蛋白产生多个非结构蛋白，还切割宿主蛋白对其功能造成影响，但对其是否切割病毒自身其他蛋白尚不清楚。NSP5 在底物识别序列的 P1 位置表现出对谷氨酰胺（Q）的偏好性，在 P2 位置是亮氨酸（L）、苯丙氨酸（F）或缬氨酸（V）。按照上述 NSP5 识别序列特征，在 ORF7a 的氨基酸序列中，第 93 和 94 位是缬氨酸和谷氨酰胺（VQ），这可能是 NSP5 对 ORF7a 的潜在识别位点。为验证这一推测，在 NSP5 和 ORF7a 双质粒转染实验中，通过 Western Blot 观察到 NSP5 切割 ORF7a，并且随着 NSP5 的量增加，ORF7a 的表达量减少。NSP5-C145A 是 NSP5 功能失活突变体，随着 NSP5-C145A 的量的增加，ORF7a 的量并没有逐渐减少，进一步证明 NSP5 对 ORF7a 的切割。FRET 检测 NSP5 对 ORF7a 的酶切活性，结果显示，随着 NSP5 剂量的增加，FRET 现象逐渐减弱，说明 NSP5 切割 ORF7a 量逐渐增多，这与上述 Western Blot 结果一致。以上三个实验证实，新冠病毒 NSP5 对自身 ORF7a 具有切割作用。

进一步研究 NSP5 对 ORF7a 的具体切割位点，构建了 ORF7a 潜在切割位点系列突变体，与 NSP5 双质粒共转染实验的结果显示，Q21，Q76 位点的突变对 NSP5 的切割有影响，但未能阻止 NSP5 对 ORF7a 的切割。参考最新证实的谷氨酸（E）位点也是 NSP5 识别位点的报道，我们进一步构建了 ORF7a 的 Q 与 E 的突变体，二者均在一定程度上减弱了 NSP5 的切割，但都未能完全阻止 NSP5 对 ORF7a 的切割，提示 NSP5 对 ORF7a 具有复杂切割位点，需进一步研究挖掘所有 NSP5 识别切割序列。

再进一步研究 NSP5 切割 ORF7a 产物的亚细胞定位和功能。已有报道新冠病毒 ORF7a 定位在细胞质，特别是高尔基体上。本研究证实了 ORF7a 定位在细胞质和细胞膜，与 NSP5 共转后，ORF7a 部分入核，改变了 ORF7a 细胞质定位，另外 ORF7a 膜定位消失，说明 NSP5 切割改变 ORF7a 的亚细胞定位。体外 T 细胞激活实验表明，NSP5 切割后的小分子切割产物可在体外刺激 T 细胞激活。

综上所述，本课题首次发现 NSP5 切割自身附属蛋白 ORF7a 并具有复杂识别位点，NSP5 切割改变 ORF7a 的亚细胞定位，切割产物对 T 细胞激活有刺激作用。本

研究加深了对病毒蛋白与宿主复杂相互作用的认识，扩展了对新冠病毒蛋白功能的了解。

关键词：SARS-CoV-2; NSP5; ORF7a; Cleavage

ABSTRACT

SARS-CoV-2 is a highly pathogenic human coronavirus. Its spread among humans and various species has a huge impact on global health and economy. NSP5 is the main protease of the virus, which not only cleaves the viral polyprotein to produce multiple non structural proteins, but also cleaves the host protein and affects its function. However, it is still unclear whether it cleaves other proteins of the virus itself. NSP5 exhibits a preference for glutamine (Q) at the P1 position of the substrate recognition sequence, and leucine (L), phenylalanine (F), or valine (V) at the P2 position. According to the above NSP5 recognition sequence characteristics, in the amino acid sequence of ORF7a, the 93rd and 94rd positions are valine and glutamine (VQ), which may be a potential recognition site for ORF7a by NSP5. To verify this hypothesis, in the double plasmid transfection experiment of NSP5 and ORF7a, Western Blot was used to observe that NSP5 cleaves ORF7a, and as the amount of NSP5 increases, the expression level of ORF7a decreases. NSP5-C145A is an inactivated mutant of NSP5, and as the amount of NSP5-C145A increases, the amount of ORF7a does not gradually decrease, further proving the cleavage of ORF7a by NSP5. FRET detection showed that with the increase of NSP5 dosage, the FRET phenomenon gradually weakened, indicating that the amount of NSP5 cleaving ORF7a gradually increased, which is consistent with the Western Blot results mentioned above. The above three experiments confirmed that SARS-CoV-2 NSP5 has a cutting effect on its ORF7a.

Further research was conducted on the specific cleavage sites of NSP5 on ORF7a, and a series of potential cleavage site mutants for ORF7a were constructed. The results of co transfection experiments with NSP5 double plasmids showed that mutations at Q21 and Q76 sites had an impact on the cleavage of NSP5, but could not prevent NSP5 from cleaving ORF7a. Referring to the latest confirmed reports that the glutamate (E) site is also a recognition site for NSP5, we further constructed mutants of Q and E for ORF7a, both of which to some extent weakened the cleavage of NSP5, but failed to completely prevent NSP5 from cutting ORF7a, indicating that NSP5 has complex cleavage sites for ORF7a, and further research is needed to explore all NSP5 recognition cleavage sequences.

Further study the subcellular localization and function of NSP5 cleaving ORF7a

products. It has been reported that SARS-CoV-2 ORF7a is localized in the cytoplasm, especially on the Golgi apparatus. In this study, ORF7a was localized in the cytoplasm and cell membrane. After co transfection with NSP5, ORF7a partially entered the nucleus, altering the cytoplasmic localization of ORF7a. In addition, ORF7a membrane localization disappeared, indicating that NSP5 cleavage altered the subcellular localization of ORF7a. In vitro T cell activation experiments have shown that the small molecule cleavage products of NSP5 can stimulate T cell activation in vitro.

In summary, this study found for the first time that NSP5 cleaves its own accessory protein ORF7a and has complex recognition sites. NSP5 cleavage alters the subcellular localization of ORF7a, and the cleavage products have a stimulating effect on T cell activation. This study deepened the understanding of the complex interactions between viral proteins and hosts, and expanded the understanding of the functions of SARS-CoV-2 proteins.

Key words: SARS-CoV-2; NSP5; ORF7a; Cleavage

目 录

1 文献综述.....	1
1.1 冠状病毒.....	1
1.1.1 冠状病毒的基因组结构.....	1
1.1.2 新冠病毒的生物学特征.....	2
1.1.3 新冠病毒的生命周期.....	2
1.2 新冠病毒蛋白的功能.....	3
1.2.1 结构蛋白的功能.....	3
1.2.2 非结构蛋白的功能.....	5
1.2.3 附属蛋白的功能.....	7
1.3 新冠病毒 NSP5 和 ORF7a.....	8
1.3.1 新冠病毒 NSP5	8
1.3.2 新冠病毒 ORF7a	9
2 新冠病毒 NSP5 切割对 ORF7a 与宿主互作的影响研究	11
2.1 引言.....	11
2.2 研究方法和技术路线.....	11
2.3 研究目的与意义.....	12
2.4 新冠病毒 NSP5 对 ORF7a 的作用.....	12
2.4.1 引言	12
2.4.2 材料.....	12
2.4.3 方法.....	16
2.4.4 实验结果.....	20
2.4.5 讨论与小结.....	24
2.5 寻找新冠病毒 NSP5 切割 ORF7a 的产物	24
2.5.1 引言	24
2.5.2 材料.....	24
2.5.3 方法.....	26
2.5.4 实验结果.....	30
2.5.5 讨论与小结.....	37
2.6 新冠病毒 NSP5 切割 ORF7a 的功能研究及其产物与宿主的 互作鉴定	37
2.6.1 引言	37
2.6.2 材料.....	38
2.6.3 方法.....	40
2.6.4 实验结果.....	44

2.6.5 讨论与小结.....	48
3 总结与展望.....	49
参考文献.....	51

1 文献综述

1.1 冠状病毒

1.1.1 冠状病毒的基因组结构

冠状病毒的基因组结构是 5'MTR-复制酶/转录酶-刺突(S)-包膜(E)-膜(M)-核衣壳(N)-3'MTR-poly(A)尾 (图 1.1)。ORF1a 和 ORF1b 几乎占据了基因组的 2/3, 并产生多聚蛋白 pp1a 和 pp1ab, 在木瓜蛋白酶样蛋白酶 (PL pro) 和 3C 样主蛋白酶 (3CLpro 或 M pro) 的切割下形成 16 种非结构蛋白 (NSP), 其中 PL pro 在该多聚蛋白的 N 端切割产生 NSP1, NSP2, NSP3, 3CLpro 在多聚蛋白下游切割以释放 NSP4-NSP16。在 ORF1a 和 ORF1b 之后的开放阅读框中翻译了四种结构蛋白, S, E, M, N, 这是冠状病毒组装所必需的^[1], 也是冠状病毒中最为常见的蛋白质。除此以外, 还有一些附属蛋白分布在基因组链中, 但在不同的冠状病毒中, 附属蛋白的数量和功能活性也不尽相同。比如, 在中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-COV) 中编码了 5 个附属蛋白 (ORF3, 4a, 4b, 5 和 8b), 在严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 (SARS-COV) 中编码了 8 个附属蛋白 (ORF3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b, 9b)^[2], 而在严重急性呼吸系统综合征新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 中翻译了 9 个附属蛋白 (ORF3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 9c, 10)。

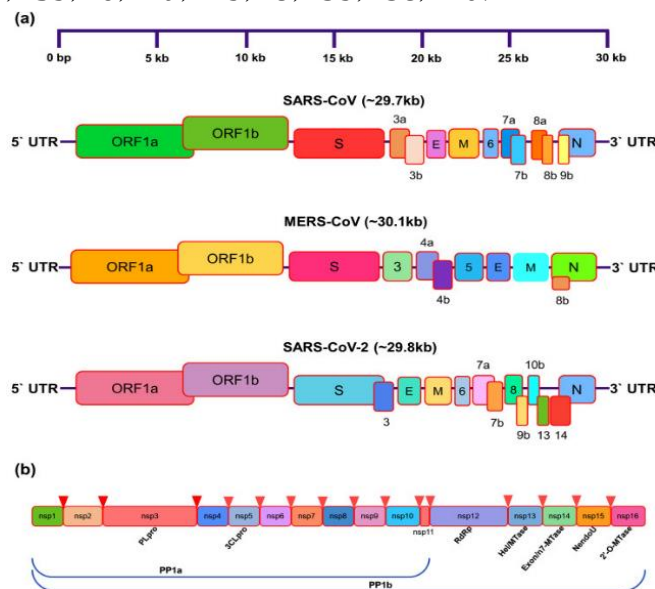


图 1.1 SARS-COV, MERS-COV 和 SARS-CoV-2 基因组中的(a)基因组组织(b)功能域^[2]

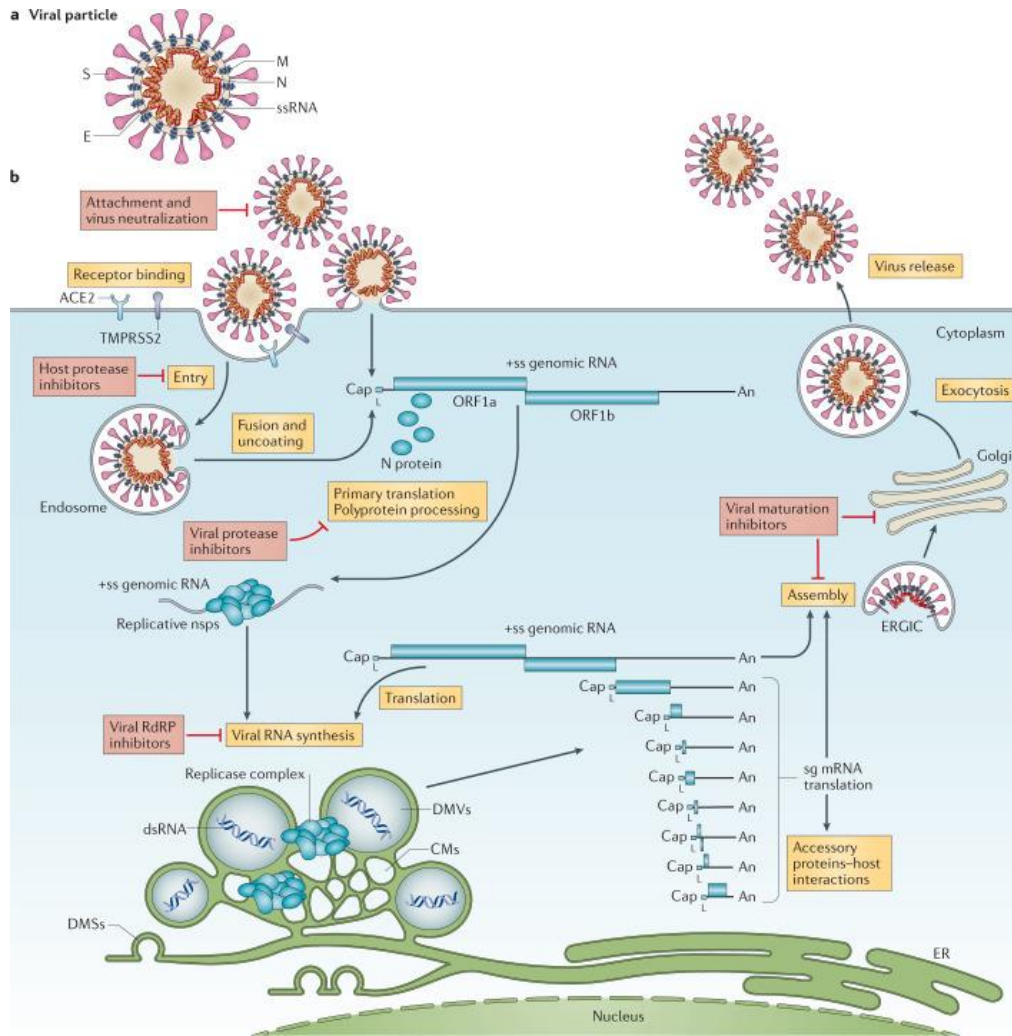
Fig. 1.1 Schematic representation for (a) genome organization and (b) functional domains in the genome of SARS-COV, MERS-COV, and SARS-CoV-2^[2]

1.1.2 新冠病毒的生物学特征

SARS-CoV-2 作为 β 冠状病毒属的一种新型正链 RNA 病毒，基因组大小为 29.99kb^[3]，其基因组序列与 SARS-COV 的一致性为 79%，与 MERS-COV 的基因组序列的一致性为 50%^[4]。占据基因组三分之二的 ORF1ab 翻译的多聚蛋白 pp1ab 被其中的 PL pro 和 3CLpro 水解切割成 16 个非结构蛋白 NSP1-16，它们以各种方式促进新冠病毒在人体内的复制，合成和组装，在破坏先天免疫反应以防止宿主进攻病毒方面也发挥着重要作用^[5]。刺突蛋白从病毒表面突出，是病毒与宿主细胞的第一个锚定点^[6]；核衣壳蛋白将病毒 RNA 组装成螺旋的核糖核衣壳（RNP）^[7]；膜蛋白和包膜蛋白在组装病毒粒子的过程中起主要作用^[6]。还有 9 种附属蛋白 ORF3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b, 9b 分布在基因组中，它们通过参与干扰素（IFN）信号传导在免疫逃逸方面发挥着重要作用^[8]。

1.1.3 新冠病毒的生命周期

核衣壳蛋白能够包裹正义单链 RNA 基因组（+ssRNA），而在病毒颗粒的组装过程中，膜蛋白和包膜蛋白则起到了保障基因组包入其中的作用。刺突蛋白三聚体会突出于病毒并通过与特定的细胞受体结合来进行特异性识别。冠状病毒颗粒具备与细胞受体（例如血管紧张素转换酶 2，ACE2）的特异性识别能力，同时也能与细胞附着因子（如跨膜蛋白酶丝氨酸 2，TMPRSS2）发生相互作用，以实现病毒与细胞的高效融合和进入。病毒外壳脱包，基因组进入细胞，并翻译出两个大的多聚蛋白 pp1a 和 pp1ab。在 PL pro 和 3CLpro 或 M pro 的切割下形成 16 种非结构蛋白。同时，多种形成的囊泡和膜球作为病毒复制的产物，创造了一个有保护功能的微环境，以促进病毒基因组的复制并进行后续的转录。其中，特征性内含的冠状病毒 mRNA 被包含在 sg mRNA 中。翻译后的结构蛋白转移到内质网（ER）膜中，并通过 ER 转运到高尔基体中间区室（ERGIC），与 N 蛋白封装的新产生的基因组 RNA 相互作用，并进入分泌囊泡区室的腔体。最终，感染的细胞通过胞吐作用将病毒粒子释放出来（图 1.2）^[9]。

图 1.2 冠状病毒粒子和生命周期^[9]Fig. 1.2 The coronavirus virion and life cycle^[9]

注：a：病毒结构示意图。b：冠状病毒生命周期示意图。

1.2 新冠病毒蛋白的功能

1.2.1 结构蛋白的功能

病毒渗透宿主细胞的过程涉及与宿主细胞膜的结合和融合，常由 S 蛋白导向实现。S 蛋白以同源三聚体形式组装，并插入多个拷贝于病毒颗粒膜中，使其呈现冠状形态。多种病毒感染时常通过切割糖蛋白为细胞外亚基和跨膜亚基来完成细胞入侵，即病毒在从产生病毒的细胞中释放之前就发生了切割。而一些冠状病毒的 S 蛋白在感染细胞的生物合成过程中，则被切割成 S1 和 S2 亚基，与之不同的是，其他冠状病毒的 S 蛋白仅在到达下一个靶细胞时才会被切割^[10]。SARS-CoV-2 与 MERS-

COV 一样，属于第一类：其 S 蛋白被病毒产生细胞中的前蛋白转化酶（如弗林蛋白酶）切割^[11-12]。病毒的进入蛋白与受体结合，通常会与其他触发因素结合，使两个亚基的构象发生剧烈变化，进而使病毒与细胞膜结合形成一个融合孔，使病毒基因组能够到达细胞的细胞质。对于 SARS-CoV-2，其中的一个触发因素是 S2 亚基内部称为“S2”位点的裂解，病毒与 ACE2 的结合暴露了“S2”位点，TMPRSS2 在细胞膜表面切割“S2”^[13-15]或组织蛋白酶 L 在 ACE2 介导的内吞作用过程中产生的内体区室中切割^[16-17]，从而释放融合肽，形成融合孔，由此病毒基因组得以进入细胞质。融合肽的无缝结合使得其扩大，进而促成病毒和细胞膜之间的融合，这一系列步骤具有重要意义。

SARS-CoV-2 N 蛋白的基本功能是将病毒基因组包装成核糖核衣壳颗粒。因此，N 蛋白应该具有识别和结合 RNA 的能力，许多研究已经证明了这一点^[18]。在 SARS-CoV-2 N 的 N 末端结构域（NTD）中，突出的 β 发夹主要由碱性氨基酸残基组成。对表面静电势的进一步分析显示，在碱性发夹和核心结构之间的连接处有一个带正电的口袋，该口袋作为假定的 RNA 结合位点^[19]。先前的研究已经证明，在 N-CTD 二聚体的螺旋面上存在另一个 RNA 结合域，该结构域具有带正电荷的凹槽^[18,20,21]。此外，据报道，N 端 IDR 和 LKR 均具有 RNA 结合活性^[22]。在增加结合亲和力的同时，它们还增强了结合变构，使 N 蛋白能够以高合作性结合 RNA^[23]。综上所述，这些信息表明 NTD、CTD 和 N 蛋白的一些无序区域可以协同结合 RNA 以促进 RNP 包装^[24]。在宿主细胞中，N 蛋白可以以不同的方式不同程度地抑制干扰素的产生，N 蛋白通过解旋酶结构域与视黄酸诱导基因 I（RIG-I）相互作用，解旋酶结构域在免疫刺激 RNA 的结合中起重要作用，这表明 SARS-CoV-2 N 蛋白可以通过靶向细胞 RIG-I 和 RNA 识别来抑制 IFN- β 反应，这是 IFN 激活的初始步骤^[25]；N 蛋白对 JAK-STAT 这一过程也表现出显著的抑制作用，N 蛋白通过与 STAT1/STAT2 竞争性结合来干扰 STAT1 与 JAK1 以及 STAT2 与 TYK2 的相互作用，进而抑制它们在 293T 细胞中的磷酸化和随后的核易位，从而抑制干扰素刺激基因（ISGs）的表达^[26]。综上所述，N 蛋白可以有效促进病毒的广泛复制。

SARS-CoV-2 中最保守的结构蛋白之一是 M 蛋白，因为它的突变率较小，与来自另一种冠状病毒的 M 蛋白具有结构和功能相似性^[27]。M 蛋白作为一种丰富的结构蛋白，通过与结构蛋白 E、S 和 N 的异型相互作用，发挥着在病毒组装和出芽过程中的核心功能^[28-30]。除了这些异型相互作用外，M 蛋白在功能上是动态的，也可

以获得同源二聚体形式^[28,31,32]，它与 E 蛋白的相互作用可以诱导膜的曲率，并通过此过程将病毒样颗粒组装和释放出来^[28,29,30,33]。M 蛋白和 S 蛋白之间的相互作用对于 S 蛋白在内质网-高尔基体中间区室中的保留及其整合到新的病毒粒子中至关重要^[33]。总体而言，M 蛋白通过干扰素拮抗作用干扰宿主免疫反应，参与宿主细胞周期停滞，诱导内质网应激和未折叠蛋白反应，对冠状病毒诱导的自噬起作用，并具有保护性抗原功能^[34]，此外，M 蛋白同源二聚体的形成对于冠状病毒包膜组装至关重要^[35,36]。

虽然 E 蛋白是主要结构蛋白中尺寸最小的一种，但其在不同病毒亚型中具有高度保守性。然而，尚不清楚 E 蛋白在病毒侵袭、复制和释放过程中的具体作用。在病毒颗粒包膜中，E 蛋白通过与其他结构蛋白的相互作用发挥着重要功能。E 和 M 蛋白的相互作用维持了病毒颗粒的形状并促进了释放^[37,38]。当 E 和 M 在宿主细胞中共表达时，S 蛋白重新定位到内质网-高尔基体中间区或高尔基体区域^[39]。在病毒复制周期中，E 蛋白在每个感染细胞中都以高水平表达，但只有少量这种表达的 E 蛋白进入病毒膜中^[40,41]。大多数蛋白质位于细胞内转运位点，即内质网和高尔基体，它们参与病毒组装和出芽^[42]。缺乏 E 蛋白的重组冠状病毒的病毒滴度和成熟度显著降低或产生无能后代，表明 E 蛋白在病毒生产和成熟中的重要性^[43]。

1.2.2 非结构蛋白的功能

NSP1 是病毒感染诱导的细胞抗病毒反应的主要下调分子^[44,45]。NSP1 通过核糖体与位于 NSP1 C 末端结构域中的两个螺旋 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 之间的紧密相互作用，在 mRNA 进入通道与宿主核糖体结合^[46,47]，NSP1 的结合诱导了一般的宿主翻译抑制，从而能够劫持宿主重新定向到病毒蛋白合成。

SARS-CoV-2 病毒编码的 NSP2 蛋白通过选择 Grb10 相互作用的 GYF 蛋白 2 (GIGYF2)/4EHP 复合物进一步阻碍 GIGYF2/4EHP 蛋白复合物来抑制 I 型干扰素 β 的 mRNA 的翻译^[48]。有研究发现 NSP2 通过 GIGYF2 与 miRNA 诱导沉默复合物 (miRISC) 的核心成分 argonaute 2 (AGO2) 相互作用，并增强了由细胞 mRNA 的 3' 非翻译区中的天然 miRNA 结合位点介导的翻译抑制^[49]。

SARS-CoV-2 的 PL pro 和 SARS-COV 的 PL pro 具有 83% 的序列同一性，但表现出不同的宿主底物偏好性：SARS-CoV-2-PLpro 优先切割泛素样干扰素刺激基因 15 蛋白 (ISG15)，而 SARS-COV-PL pro 主要靶向泛素链，在感染后，SARS-CoV-2-PLpro 有助于干扰素反应因子 3 (IRF3) 裂解 ISG15，并减弱 IFN 反应^[50]。

研究发现 NSP4 通过其与 BCL2 拮抗剂/杀伤剂 (BAK) 的相互作用介导大孔形成, 进而引起广泛的线粒体结构变化、外膜大孔形成和载有线粒体 DNA (mtDNA) 的内膜囊泡的释放, mtDNA 激活经典的 cGAS/STING1 介导的干扰素信号转导和 NLRP3 炎症小体形成^[51]。

SARS-CoV-2 的 RNA 复制通过构建膜结合的复制细胞器 (RO) 来实现^[52], RO 由双膜囊泡 (DMV) 组成, 通过薄膜连接到内质网上^[53], NSP6 在其中起到三个主要作用: 在 RO-ER 通信中充当过滤器, 允许脂质流动但限制 ER 腔蛋白进入 DMV, 定位和组织 DMV 簇, 以及通过 LD 拴系复合物 DFPC1-Rab18 介导与脂滴 (LD) 的接触, 因此, NSP6 充当 DMV 簇的组织者, 并且可以提供选择性轨道, 用 LD 衍生的脂质对其进行翻新^[54]。

SARS-CoV-2 NSP7 通过靶向 RIG-I/MDA5、Toll 样受体 (TLR3)-TRIF 和 cGAS-STING 信号通路抑制 I 型和 III 型干扰素的产生; NSP7 抑制了由仙台病毒或 SARS-CoV-2 病毒样颗粒转染和感染诱导的 IFN 和 IFN 刺激基因的表达; NSP7 损害了细胞溶质 dsRNA 感应通路组分激活的 I 型和 III 型 IFN 的产生, 包括 RIG-I、MDA5 和 MAVS, 但不包括 TBK1、IKK ϵ 和 IRF3-5D (IRF3 的活性形式)^[55]。

研究表明 NSP8 存在于线粒体上并诱导线粒体损伤以启动线粒体自噬, NSP8 的 N 端与线粒体共定位, C 端诱导自噬/线粒体自噬, 这一研究拓展了 NSP8 对线粒体损伤和自噬方面的认识^[56]。与 NSP7 相似, 研究发现 NSP8 也通过作用于 RIG-I/MDA5 和信号分子 TRIF 和 STING 来抑制 I 型和 III 型干扰素的产生, NSP8 还损害了由信号分子 RIG-I、MDA5 和 MAVS 的过表达触发的 IFN 表达, 而不是 TBK1 和 IRF3-5D^[57]。

宿主蛋白葡萄球菌核酸酶结构域蛋白 1 (SND1) 可识别 SARS-CoV-2 的负义 RNA, 并且是人类细胞中病毒 RNA 合成所必需的。SND1 直接与 NSP9 相互作用, 两种蛋白结合负义病毒 RNA。NSP9 在起始位点与病毒 RNA 共价连接, 表明 NSP9 参与了病毒 RNA 合成的启动^[58]。

NSP10 有助于提高 NSP14-ExoN 的活性, 是原先的 35 倍, 并通过辅助作用促使 NSP16 将 cap-0 甲基化转化为 cap-1^[59]。NSP10 在形成与 NSP14 和 NSP16 的复合物的过程中充当辅助因子, 参与病毒 mRNA 5'端的 RNA 帽子结构生成, 病毒通过调整病毒 RNA 的 5'末端以模仿宿主细胞 RNA 帽子结构, 这对病毒 RNA 的稳定性、蛋白翻译以及病毒免疫逃逸都具有重要意义^[60]。

研究结果显示,鼠肝炎病毒 NSP11 蛋白的切割变异体 NSP10/NSP11 无法参与病毒的复制过程^[61],同样,禽冠状病毒传染性支气管炎病毒的切割变异体 NSP10-NSP11/NSP12 在病毒复制中并非必要存在^[62]。同时,据 CD 光谱分析显示,截至目前,对 SARS-CoV-2 中 NSP11 结构的研究确认其处于无序状态^[63]。

SARS-CoV-2 NSP12 是病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRp),抑制宿主抗病毒反应。SARS-CoV-2 NSP12 以剂量依赖性方式减弱仙台病毒或 poly (I: C) 诱导的 IFN- β 启动子激活。它还抑制了由 RIG-I、MDA5、MAVS 和 IRF3 过表达触发的 IFN 启动子激活。NSP12 不损害 IRF3 磷酸化,但抑制 IRF3 的核易位^[64]。

SARS-CoV-2 NSP13 的表达减轻了由 I 型和 II 型 IFN 反应增强子元件驱动的转录活性。它还阻止了 STAT1 和 STAT2 的核易位。NSP13 对 IFN 信号转导的抑制发生在 STAT1 磷酸化步骤^[65]。

SARS-CoV-2 NSP14 蛋白有助于病毒激活核转录因子 (NF- κ B) 信号传导。NSP14 引起 NF- κ B p65 的核易位,还诱导 IL-6 和 IL-8 上调^[66]。

在各种冠状病毒感染期间,保守的 NSP15 核糖核酸内切酶 (EndoM) 限制了双链 RNA (dsRNA) 诱导通路的激活,包括干扰信号传导、蛋白激酶 R (PKR) 和寡腺苷酸合成酶/核糖核酸酶 L (OAS/RNase L) ^[67]。

NSP16 是一种 2'-O-甲基转移酶,在免疫逃避中起着至关重要的作用,NSP16 需要结合伴侣 NSP10 来激活其将 mRNA 甲基化以提高翻译效率^[68]。

1.2.3 附属蛋白的功能

ORF3a 可以与 STING 相互作用并破坏 STING-LC3 相互作用,从而阻断 cGAS-STING 诱导的自噬,但不能阻断 IRF3-I 型 IFN 诱导。ORF3a 的这种新功能与靶向自噬体-溶酶体融合不同,是对 STING 触发的自噬的选择性抑制,以促进病毒复制^[69]。

研究表明 SARS-CoV-2 ORF3b 蛋白是一种有效的干扰素调节因子拮抗剂,相较于其与 SARS-COV 的同源物,其对 I 型干扰素的诱导抑制作用更为显著^[70]。据观察,ORF3b 的 IFN 拮抗作用可能与其蛋白质 C 末端的长度及亚细胞定位相关,并且这些特征都与 SARS-CoV-2 ORF3b 阻碍 IRF3 核易位的能力有关,而 IRF3 是 IFN 表达的重要调控因子^[71]。

SARS-CoV-2 ORF6 通过与 mRNA 输出因子 Rae1 和 Nup98 的相互作用阻止多种宿主因子的核输入,破坏双向核质转运,这种破坏阻止了受感染的细胞对入侵病

毒的反应^[72]。

SARS-CoV-2 ORF7b 促进 IFN- β 、TNF- α 和 IL-6 的表达，通过 IRF3 磷酸化激活 I 型 IFN 信号，并激活 TNF α 诱导的 HEK293T 细胞和 Vero E6 细胞凋亡^[73]。

SARS-CoV-2 ORF8 编码的病毒蛋白在所有病毒蛋白中与 SARS-COV 的同源性最小，直接与主要组织相容性复合体 I（MHC-I）分子相互作用并介导其下调。在表达 ORF8 的细胞中，MHC-I 分子通过自噬选择性靶向溶酶体降解，损害抗原呈递系统^[74]。

ORF9b 靶向 NF- κ B 必需调节剂 NEMO，并在病毒刺激时中断其 K63 连接的多泛素化，从而抑制经典的 IKK $\alpha/\beta/\gamma$ -NF- κ B 信号传导和随后的干扰素产生^[75]。

ORF9c 损害干扰素信号传导、抗原呈递和补体信号传导，同时诱导 IL-6 信号传导，与多个细胞区室中的膜蛋白相互作用，并损害肺上皮细胞系中的抗病毒过程^[76]。

SARS-CoV-2 ORF10 靶向 STING 以拮抗 IFN 激活，ORF10 通过阻断 STING 的易位以及 STING 和 TBK1 之间的相互作用来拮抗先天抗病毒免疫，从而损害 cGAS-STING 信号传导^[77]。

1.3 新冠病毒 NSP5 和 ORF7a

1.3.1 新冠病毒 NSP5

NSP5，也称为 3-胰凝乳蛋白酶样蛋白酶（3CL pro），是一种半胱氨酸蛋白酶，在病毒中是一种非结构蛋白，可水解病毒多聚蛋白，在病毒复制中产生功能蛋白 NSP4-NSP16，在病毒生命周期中起着非常重要的作用^[78]。SARS-CoV-2 NSP5 可以诱导细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 IL-2 在 Calu-3 和 THP1 细胞中的表达，NSP5 能够促进 MAVS 泛素样翻译后修饰，从而提高其稳定性，导致 MAVS 蛋白水平升高和 NF- κ B 信号通路的激活^[79]。而 SARS-CoV-2 NSP5 结合 N 蛋白可以通过阻止应激颗粒的形成来拮抗 RIG-I 信号通路的效应，阐明了 NSP5、应激反应和先天抗病毒免疫之间紧密的联系^[80]。

NSP5 不仅在抗病毒免疫反应中扮演重要角色，在水解切割蛋白方面也起到关键的作用。NSP5 不仅能水解切割病毒的多聚蛋白 pp1a 和 pp1ab，产生非结构蛋白 NSP4-NSP16，还能切割宿主蛋白。冠状病毒 NSP5 具有参与水解的非经典催化二元组（H41-C145），并且在底物识别序列的 P1 位置表现出对谷氨酰胺（Q）的偏好性

[81-83]。早前研究发现，猪流行性腹泻病毒（PEDV）的 NSP5 通过在 Q231 位点切割 NF- κ B 必需调节剂 NEMO 来抑制 I 型 IFN 的产生^[84]。为了探索 SARS-CoV-2 NSP5 是否也具有这种识别特征，对其切割的多聚蛋白序列进行了分析，得到图 1.3，发现 SARS-CoV-2 NSP5 在 E152、Q205 和 Q231 位置对 NEMO 进行切割，与 SARS-CoV NSP5 相比，SARS-CoV-2 NSP5 表现出更强的切割 NEMO 的能力，进一步加强了其干扰素拮抗作用^[85]。

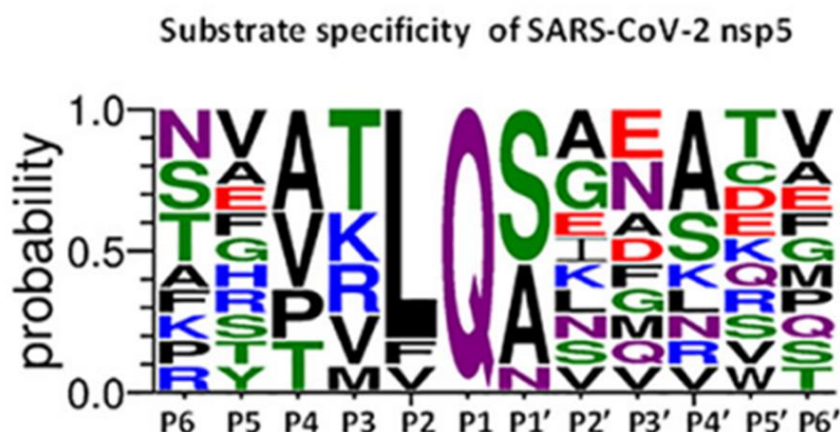


图 1.3 SARS-CoV-2 NSP5 识别的底物序列^[85]

Fig. 1.3 Substrate sequences recognized by SARS-CoV-2 NSP5^[85]

还有研究发现，SARS-CoV-2 NSP5 切割黑色素瘤相关抗原 D2（MAGED2），使得 MAGED2 的 N 端将易位到细胞核中，N 端就不能以 RNA 依赖性方式与 SARS-CoV-2 核衣壳蛋白结合，无法抑制核衣壳蛋白与病毒基因组之间的相互作用，截短的 MAGED2 就不能阻碍 SARS-CoV-2 的复制^[86]。另外，有实验表明，SARS-CoV-2 NSP5 可以识别宿主 tRNA 甲基转移酶 1（TRMT1）的 Q530，产生的 N 端切割产物在介导 tRNA m^2G 和 $m^{2,2}G$ 的生物发生方面存在缺陷，这种缺陷会抑制宿主 mRNA 翻译，严重损害蛋白质合成^[87,88]。SARS-CoV-2 NSP5 对宿主蛋白的水解切割功能尚未完全了解，但从以上研究可以看出，NSP5 对宿主蛋白的功能产生了巨大的损伤，进一步影响了宿主的先天免疫反应。

1.3.2 新冠病毒 ORF7a

自噬是一种进化上保守的生物自清洁和更新过程，对维持细胞稳态很重要。有研究表明，SARS-CoV-2 ORF7a 蛋白通过 AKT-MTOR-MLK1 介导的途径启动自噬，但 ORF7a 通过激活半胱天冬酶 3（CASP3）在天冬氨酸残基 30（D30）处切割

SNAP29 蛋白来限制自噬通量的进展，导致自噬体积累，限制了自噬体-溶酶体之间的融合，以此促进病毒的复制^[89]。

有研究筛选鉴定了 SARS-CoV-2 的 22 种蛋白，发现 NSP6 和 ORF7a 的表达以 TAK1 和 NEMO 依赖性方式诱导 NF- κ B 激活并增加 IL-8 和 IP-10 mRNA 表达，泛素化后的 NSP6 和 ORF7a 募集 NEMO，进一步激活 NF- κ B 通路，进一步诱导促炎反应^[90]。

Serine Incorporator 5 (SERINC5) 是一种多通道跨膜蛋白，可在病毒进入过程中阻止病毒与细胞融合，具备抗病毒活性^[91]。有实验证明，SARS-CoV-2 ORF7a 利用两种机制来抵消 SERINC5 的作用：阻止 SERINC5 入芽病毒粒子；ORF7a 掺入出芽病毒粒子中，与 SERINC5 和 SARS-CoV-2 的刺突蛋白形成复合物，阻碍了 SERINC5 发挥限制病毒传染的功能^[92]。这是 SARS-CoV-2 ORF7a 从未表述过的功能。

MHC-I 可以将细胞自身或病毒衍生的非自身肽呈递到细胞表面，便于下游的 CD8 T 淋巴细胞识别^[93]。SARS-CoV-2 ORF7a 能与 MHC-I 的重链产生特异性相互作用，从而减缓 MHC-I 从 ER 到细胞膜的运输速度，下调 MHC-I 的抗原呈递功能（图 1.4）^[94]。

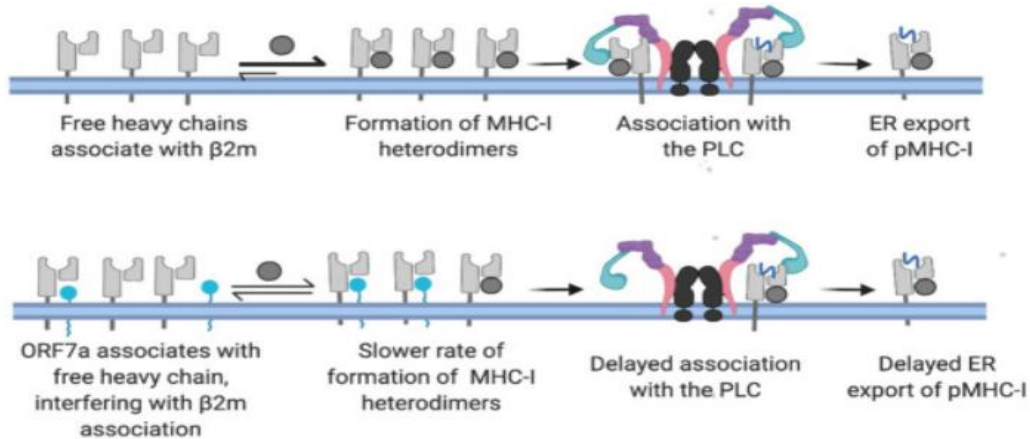


图 1.4 ORF7a 减缓 MHC-I 内质网输出的模拟图^[94]

Fig. 1.4 Simulation diagram of ORF7a slowing down MHC-I endoplasmic reticulum output^[94]

2 新冠病毒 NSP5 切割对 ORF7a 与宿主互作的影响研究

2.1 引言

在新冠病毒基因组中，ORF1a 和 ORF1b 几乎占据了基因组的 2/3，并产生多聚蛋白 pp1a 和 pp1ab，在木瓜蛋白酶样蛋白酶（PL pro）和 3C 样主蛋白酶 NSP5（3CLpro 或 M pro）的切割下形成 16 种非结构蛋白（NSP），其中 PL pro 在该多聚蛋白的 N 端切割产生 NSP1，NSP2，NSP3，3CLpro 在多聚蛋白下游切割以释放 NSP4-NSP16。NSP5 除了能切割自身的多聚蛋白，还能切割宿主蛋白，如 NSP5 切割视黄酸诱导基因蛋白 I（RIG-I）受体通路中的关键激酶 NEMO，抑制 IFN- β 的产生；NSP5 切割黑色素瘤相关抗原 D2（MAGED2），截短的 MAGED2 无法阻碍 SARS-CoV-2 的复制。

对 NSP5 切割的多聚蛋白序列进行分析，发现其在底物识别序列的 P1 位置表现出对谷氨酰胺（Q）的偏好性，P2 位置是亮氨酸（L），苯丙氨酸（F）或缬氨酸（V）。在新冠病毒附属蛋白 ORF7a 的第 93 和 94 位是 VQ，该位点可能是 NSP5 的识别位点，NSP5 可能切割 ORF7a，切割产物可能对其功能产生影响。

2.2 研究方法和技術路线

本课题通过 Western Blot 和 FRET 实验研究 NSP5 是否切割 ORF7a，在真核和原核表达两个方面寻找切割产物，通过免疫荧光和 T 细胞激活实验研究切割对 ORF7a 产生的影响，以及利用 IP-MS 技术筛选切割产物的互作蛋白。技术路线如下：

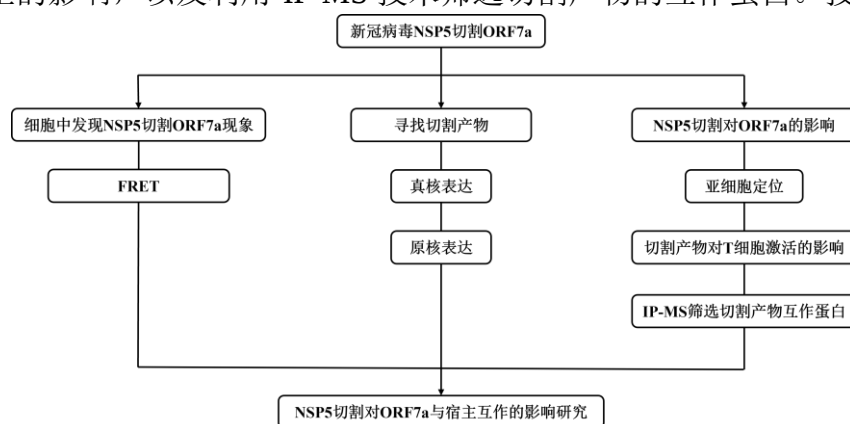


图 2.1 技术路线示意图

Fig. 2.1 Technical roadmap diagram

2.3 研究目的与意义

本课题首次发现新型冠状病毒蛋白 NSP5 切割 ORF7a 蛋白，评价 NSP5 切割对 ORF7a 功能的影响，利用 IP-MS 及 Co-IP 技术筛选及鉴定切割产物的互作蛋白，探索 ORF7a 切割产物对病毒与宿主互作的影响，并对其功能展开研究。

本课题的实施与完成拓展了新冠病毒 NSP5 切割自身 ORF7a 的认识，加深对病毒蛋白与宿主复杂相互作用的理解，为更深入理解新冠病毒感染的致病机制提供新视角。

2.4 新冠病毒 NSP5 对 ORF7a 的作用

2.4.1 引言

新冠病毒（SARS-CoV-2）感染所致新冠肺炎是一种对人类健康和公共卫生构成严重威胁的疾病。NSP5，也称为 3C 样蛋白酶和主蛋白酶，是一种分子量约为 30kd 的半胱氨酸蛋白酶，在已知的冠状病毒中具有保守的结构和功能，主要参与多聚蛋白 pp1a 和 pp1ab 的水解加工过程，产生非结构蛋白 NSP4-NSP16，在病毒生命周期中起着重要作用^[78]。使冠状病毒 NSP5 具有酶活性的位点包含第 145 位的半胱氨酸残基，对底物识别序列的 P1 位置的谷氨酰胺具有偏好性^[81-83]。

荧光共振能量转移（Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET）指的是在满足适当的光谱重叠和邻近性要求时，通过将供体荧光基团的激发能量转移到相邻的受体荧光团，从而使受体发出荧光^[95]。FRET 通常被广泛应用于监测多种生化过程，例如蛋白质相互作用、构象变化、细胞内离子浓度和酶活性的测定等^[96]。

本章将通过 NSP5 和 ORF7a 双质粒共转染表达，Western Blot 观察二者的表达量情况，并通过 FRET 实验研究 NSP5 对 mTPF1-ORF7a -Venus 荧光能量转移的影响。

2.4.2 材料

2.4.2.1 细菌

E. coli DH5 α 菌株为实验室自制。

2.4.2.2 细胞

人胚胎肾细胞 HEK-293T 购自中国科学院北京细胞库。

2.4.2.3 质粒

根据 NCBI 上 SARS-CoV-2 ORF7a 和 NSP5 的基因信息（登录号为 NC_045512.2）合成和构建质粒。质粒合成由擎科生物科技有限公司提供，质粒信息如下表：

表 2.1 质粒种类

Tab. 2.1 The type of plasmid

质粒名称
pcDNA3.1-myc-ORF7a-flag
pcDNA3.1-NSP5-HA
PEGFPN1-flag-NSP4-5
pcDNA3.1-NSP5-C145A-HA
pcDNA3.1-mTFP1-ORF7a-Venus

2.4.2.4 试剂及耗材

表 2.2 实验试剂及耗材

Tab. 2.2 Experimental reagents and consumables

名称	厂家
胰蛋白胨, Yeast Extract, NaCl, 氨苄青霉素, 卡那霉素, 4S Read Plus Nucleic Acid Stain, 核酸 maker, Glycine, SDS, Tween-20, Tris	上海生工生物工程股份有限公司
甲醇	天津市致远化学试剂有限公司
50xTAE 缓冲液, RIPA, 30% (w/v) 丙烯酰胺溶液, 过硫酸铵 (APS), PMSF, TEMED, 脱脂奶粉, 青链霉素混合液, 20xPBS, 二甲基亚砷 (DMSO)	Solarbio
HindIII, BamHI	SibEnzyme
无内毒素质粒小提中量试剂盒, 普通 DNA 产物纯化试剂盒	TIANGEN
Ex Taq	TaKaRa

续表 2.2 实验试剂及耗材

Continued Tab. 2.2 Experimental reagents and consumables

名称	厂家
EasyPure® Quick Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒	TransGen Biotech
ECL 发光液	新赛美生物科技有 限公司
β -Tubulin 抗体	武汉亚克因生物技 术有限公司
山羊抗小鼠/兔 IgG 抗体, Flag、HA、GFP 标签抗体	武汉三鹰生物技术 有限公司
DMEM 培养基	GIBCO
胰酶细胞消化液	Biosharp
Fetal Bovine Serm, T75	SORFA
PEI	Ploysciences
琼脂糖	BIOWEST
LightNing™ DNA Assembly Mix Plus	江苏百时美生物科 技有限公司
T25, 六孔板	NEST
酶标板, 无 DNA/RNA 酶 1.5ml 离心管	CELLPRO
PVDF 膜	Millipore

2.4.2.5 试剂配制

表 2.3 试剂配制

Tab. 2.3 Reagent compounding

名称	配制方法
1MTris-HCl (pH6.8)	称取 60.955 g Tris 于 400 ml 超纯水中溶解, 调节 pH 至 6.8, 定容至 500 ml, 0.45 μ m 滤器过滤
1.5MTris-HCl (pH8.8)	称取 90.85 g Tris 于 400 ml 超纯水中溶解, 调节 pH 至 8.8, 定容至 500 ml, 0.45 μ m 滤器过滤
1xRunning Buffer	称取 3 g Tris, 18.8 g 甘氨酸, 1 g SDS 超纯水定容至 1 L

续表 2.3 试剂配制

Continued Tab. 2.3 Reagent compounding

名称	配制方法
1xRunning Buffer (1 L)	称取 3 g Tris, 18.8 g 甘氨酸, 1 g SDS 超纯水定容至 1 L
1xTrans Buffer (1 L)	称取 3.025 g Tris, 14.425 g 甘氨酸, 加入 200ml 甲醇, 超纯水定容至 1L
10xTBS	称取 40 g NaCl, 1 g KCl, 15 g Tris, 加 400ml 超纯水溶解, 调 pH 至 7.4, 定容至 500ml
TBST	于 450ml 超纯水中稀释 50ml 10xTBS, 加入 500 μ l Tween-20 后混匀
5%脱脂牛奶 (20 ml)	称取 1g 脱脂奶粉溶解于 20mlTBST

2.4.2.6 实验仪器

表 2.4 实验仪器

Tab. 2.4 Experimental instruments

仪器	品牌
离心机	基因科技(武汉)有限公司
生物安全柜	Heal Force
细胞培养箱	New Brunswick
高压灭菌锅	ZEALWAY
细菌培养箱	MEMMERT
涡旋振荡器	DWB
恒温摇床	上海知楚仪器有限公司
电泳仪电源, 紫外凝胶成像分析仪	BOYGENE
垂直电泳仪	南京裕成实验设备有限公司
蛋白转印槽, 金属浴	Monad
蛋白印迹显像系统	GE Healthcare
PCR 仪	赛默飞世尔科技
纯水仪	美国 ELGA

2.4.3 方法

2.4.3.1 细胞复苏

将生物安全柜提前打开紫外灯照射 30 分钟，用镊子取 75%酒精浸湿的棉球擦拭台面，将所用物品和试剂表面喷洒 75%酒精后放入生物安全柜中，试剂需要恢复至室温后使用。下一步是配制培养基，总体积 50ml 的培养基中加入 90%的 DMEM 和 10%的 FBS，吹吸混匀，取 4ml 配制好的培养基加入到 T25 培养瓶中，放入 37℃ 细胞培养箱中使培养基预热到 37℃。将冻存的 HEK-293T 细胞从液氮中取出，迅速放入提前预热到 37℃的水浴锅中，待完全融化后取出放入安全柜中。将细胞从冻存管中吸出转移至 1.5ml EP 管，800rpm 离心 5min，尽量吸净上清，加入 1ml 培养基重悬细胞，将预热好的 T25 从培养箱中取出，将重悬的细胞加入到 T25 中，轻轻混匀，放入细胞培养箱中培养。

2.4.3.2 细胞传代

观察细胞密度达 80%以上时准备传代，提前将所需试剂从 4℃冰箱取出，恢复至室温，将细胞培养瓶从培养箱取出放入安全柜，去除培养基，吸取适量 PBS 加入培养瓶中，洗去培养基，PBS 洗两次，加入适量胰酶消化细胞，观察到细胞悬浮后加入 1ml 含有血清的培养基终止消化，转移到离心管中，巴氏吸管多次吹吸混匀，1000rpm 离心 5min，去除上清，加入 3ml 新鲜培养基重悬细胞，吸取一定比例细胞悬液到新的培养瓶中，加入培养基混匀，75%酒精消毒后放入细胞培养箱培养。

2.4.3.3 细胞计数

按照 2.3.2 方法重悬细胞后，吸取 100 μ l 细胞悬液到 900 μ l PBS 中，吹吸混匀，取 10 μ l 细胞到细胞计数板，显微镜下计数 4 个区域的细胞数量，按如下公式计算每毫升悬液中的细胞数量，进一步计算所需细胞数量的体积：

$$\text{细胞数量 / 毫升} = (\text{细胞总和} / 4) \times 10^5$$

2.4.3.4 细胞冻存

按照血清：DMSO=9：1 的比例配制冻存液，将生长状态较好且密度达 80%以上的细胞按 2.4.3.2 方法离心细胞，加入适量冻存液重悬细胞，按 1ml/管将细胞分装到冻存管中，在管壁标记细胞信息和冻存日期，放入程序冻存盒中，按照-20℃ 4h，-80℃过夜，液氮长期保存的步骤逐步冻存细胞。

2.4.3.5 质粒转化

- (1) 从-80℃冰箱取出感受态并迅速放置冰上解冻；
- (2) 超净台内操作，取 1-2μl 质粒或全部连接产物加入 50μl 感受态中，吹吸混匀，冰上静置 30min；
- (3) 水浴锅提前设置到 42℃，热激 90 s，冰上孵育 5 min，注意不要剧烈晃动；
- (4) 加入 500 μl 2YT 液体培养基，37℃，220 rpm，活化 65 min；
- (5) 将菌液 2000rpm 离心 5min，去除培养基到剩余 100μl，重悬菌沉淀，将菌液涂布到含对应抗性的固体培养板上，标记质粒信息和日期，倒置在 37℃细菌培养箱过夜培养；
- (6) 观察单克隆生长状态，封口膜封口后放到 4℃冰箱以备后续实验使用。

2.4.3.6 构建 pcDNA3.1-S2NSP5-C145A-HA 表达载体

- (1) 根据 NSP5 序列信息，将第 145 位的半胱氨酸突变为丙氨酸；

表 2.5 引物信息

Tab. 2.5 Primer information

引物名称	引物序列 (5'-3')
S2NSP5C1 45A-1-F	GTTTAAACTTAAAGCTTATGAGCGGGTTCCGGAAGAT
S2NSP5- C145A-1- R	ATGTTGAAGCCCACGCTTCCTGCGGAGCCGTTGAGGAAGCTGC
S2NSP5- C145A-2-F	TTCCTCAACGGCTCCGCAGGAAGCGTGGGCTTCAACAT
S2NSP5- C145A-2- R	CTGGACTAGTGGATCCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTA TTGAAAGGTCACTCCAGAAC

- (2) 以 NSP5 为模板，用两对引物分别扩增，得到两个片段（片段 1 和片段 2）；

表 2.6 反应体系

Tab. 2.6 Reaction system

组分	体积
TAKARA Ex Taq	0.25 μ l
10 $\times$ Ex Taq Buffer	5 μ l
dNTP Mixture	4 μ l
Template	<500ng
Primer1	0.2-1.0 μ M
Primer2	0.2-1.0 μ M
ddH ₂ O	up to 50 μ l

表 2.7 反应程序

Tab. 2.7 Reaction procedure

温度	时间	循环数
94 °C	4min	1
94 °C	30s	35
55 °C	30s	35
72 °C	60 s/kb	35

(3) 配制琼脂糖凝胶，将 50 $\times$ TAE 稀释成 1 $\times$ TAE 后，取 25ml1 $\times$ TAE 到烧杯中，并称取 0.25g 琼脂糖倒入烧杯，加热溶解，加入 1 μ l 核酸染料，混匀，倒入凝胶槽内，凝固后，取 3 μ l 扩增产物上样，使用普通 DNA 产物纯化试剂盒将剩余的产物纯化；

(4) 将 pcDNA3.1 空载体进行双酶切反应；

表 2.8 反应体系

Tab. 2.8 Reaction system

组分	体积
10xFastCut Buffer	5 μ l
载体	5 μ g
HindIII	2.5 μ l
BamHI	2.5 μ l
ddH ₂ O	up to 50 μ l

在 37 °C 下进行酶切反应 3h，取全部酶切产物进行电泳，确定条带大小正确后使用

胶回收试剂盒进行回收;

(5) 将回收好的片段和载体用江苏百时美生物的 LightNing™ DNA Assembly Mix Plus 试剂盒进行无缝克隆连接;

(6) 10 μ l 连接产物全部进行感受态转化;

(7) 菌液 PCR: 挑单克隆到 500 μ l 培养基中在 37℃, 220rpm 摇菌 5-12h, 每种连接产物挑取 8 个, 按 10 μ l 体系进行菌液 PCR, 并进行琼脂糖凝胶电泳, 将条带大小正确的菌液送测序。

2.4.3.7 质粒提取

在 50ml 离心管中加入 15ml 2YT 培养基, 从平板挑取单克隆至离心管中, 加入 15 μ l 抗生素 (即抗生素: 培养基=1: 1000), 在 37℃, 220rpm 摇菌 12h, 使用 TIANGEN 无内毒素质粒小提中量试剂盒提取质粒。

2.4.3.8 HEK-293T 细胞转染

以 6 孔板为例:

(1) 提前一天将 1×10^6 个细胞接种到 6 孔板, 待转染时汇合度达 80%;

(2) 按质粒: PEI=1: 3 准备质粒和 PEI, 在 A 管加入 100 μ l DMEM 和质粒, 在 B 管加入 100 μ l DMEM 和 PEI, 分别混匀瞬离, 静置 5min; 将 B 管中的混合液全部加入 A 管, 混匀瞬离, 静置 20min;

(3) 将培养板中原有的培养基去除, 加入 1ml 无血清的 DMEM, 将 A 管中的混合液全部加入孔中, 轻轻混匀, 放入细胞培养箱;

(4) 待转染 6-8h 后换液, 将含有质粒和 PEI 的培养基去除, 加入 2ml 含有血清的 DMEM 培养基, 继续放入细胞培养箱培养, 根据后续实验设计收集细胞。

2.4.3.9 Western blot

(1) 提前将离心机 4℃ 预冷, 从培养箱取出细胞, 去除原有培养基, PBS 洗两次, 第三次 PBS 收集细胞, 转移到 1.5ml EP 管中, 4000rpm 离心 10min, 去除上清;

(2) 配制细胞裂解液, 在 RIPA 裂解液中加入 PMSF, 并使 PMSF 工作浓度为 1mM, 混匀, 分别加入细胞沉淀管中, 裂解 30min, 每 5min 涡旋一次, 12000rpm 离心 15min, 取上清到新的管中;

(3) BCA 定量: 配制工作液, A 液: B 液=5: 1, 每孔 200 μ l, 将标准品稀释到 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7mg/ml, 取 2 μ l 样品用 18 μ l PBS 稀释 10 倍, 加入

工作液，吹吸混匀，尽量不要有气泡，放进 37℃ 培养箱孵育 30min，在酶标仪检测 570nm 处吸光值，计算蛋白浓度。将定量的蛋白样品和上样缓冲液混匀，金属浴 100℃ 煮样 10min；

（4）根据蛋白分子量配制 SDS-PAGE 胶，上样，电泳设置 80V，观察蛋白 marker 进入分离胶后设置电泳 120V，根据 marker 分离效果结束电泳；

（5）将 SDS-PAGE 胶从玻璃板分离，放入转印夹板，附上 PVDF 膜，根据蛋白分子量设置转膜条件 110V，75min，注意转膜需低温进行；

（6）配制 5% 脱脂奶粉，脱色摇床上封闭 1h；

（7）按说明书稀释一抗，在 4℃ 过夜孵育；

（8）脱色摇床上 TBST 洗膜，一次 10min，洗三次；

（9）按说明书稀释二抗，室温孵育 1h；

（10）脱色摇床上 TBST 洗膜，一次 10min，洗三次，曝膜。

2.4.3.10 荧光共振能量转移（FRET）实验原理

在本实验中，我们采用了 mTFP1 和 Venus 作为 FRET 实验的供体和受体，并在之间插入 ORF7a 肽段将二者连接起来。在激发光为 462 nm 的情况下，观察到受体 Venus 的发射光峰值为 528 nm 的荧光强度增强，这表明融合蛋白发生了明显的 FRET 现象。然而，在经过 S2NSP5 的酶切反应后，供体和受体之间被切割分离，导致二者的空间距离增大，进而 FRET 现象减弱甚至消失（图 2.2）。

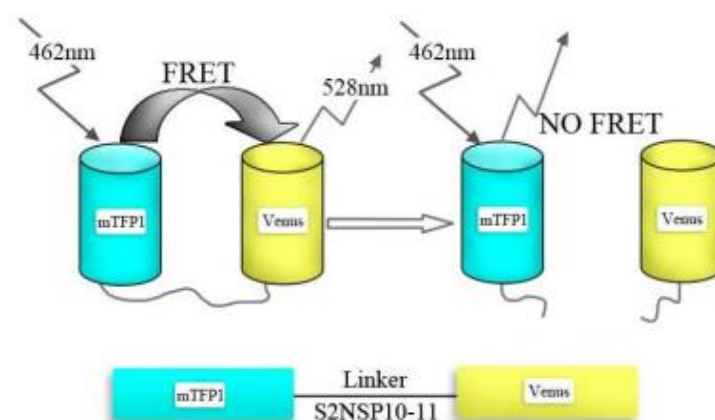


图 2.2 荧光共振能量转移（FRET）工作原理^[97]

Fig. 2.2 Fluorescence resonance Energy Transfer (FRET) works^[97]

2.4.4 实验结果

2.4.4.1 细胞中存在新冠病毒 NSP5 切割 ORF7a 现象

将 SARS-COV 和 SARS-CoV-2 及其变异株的 ORF7a 氨基酸序列在 BioEdit 上比对, 发现 ORF7a 的 NSP5 识别位点在其中高度保守, 提示我们 ORF7a 被切割后的产物功能相近 (图 2.3A)。设计细胞实验, ORF7a 定为 1 μ g, NSP5 设为 0, 0.33 μ g, 0.5 μ g, 1 μ g, 2 μ g, 3 μ g, 剩余用 pcDNA3.1 空载补足到 4 μ g, 转染到 293T 细胞, 以 β -Tubulin 作为内参。Western blot 结果显示: 随着 NSP5 的量的增加, ORF7a 的条带减少 (图 2.3B)。按总质粒为 3 μ g, NSP5 和 ORF7a 各 1.5 μ g, 在转染后 6h, 12h, 24h 收集细胞, 检测 NSP5 在不同时间对 ORF7a 的切割功能。结果显示, 表达 6h, 12h, 24h 时 NSP5 仍然切割 ORF7a (图 2.3C)。以序列中插入公认的切割识别序列 NSP4-5 为阳性对照 (图 2.4A), 并定为 2 μ g, NSP5 量以 0, 0.03 μ g, 0.06 μ g, 0.12 μ g, 0.25 μ g, 0.5 μ g, 1 μ g, 2 μ g 增加, 用 pcDNA3.1 空载体补足到 4 μ g, 检验 NSP5 是否能正常发挥切割功能。结果表明: 随着 S2NSP5 的量的增加, 阳性对照的条带逐渐减少, 并能观察到切割产物 (图 2.4B)。由此说明 S2NSP5 在细胞中正常表达并发挥识别和切割功能, 并对 ORF7a 产生切割。

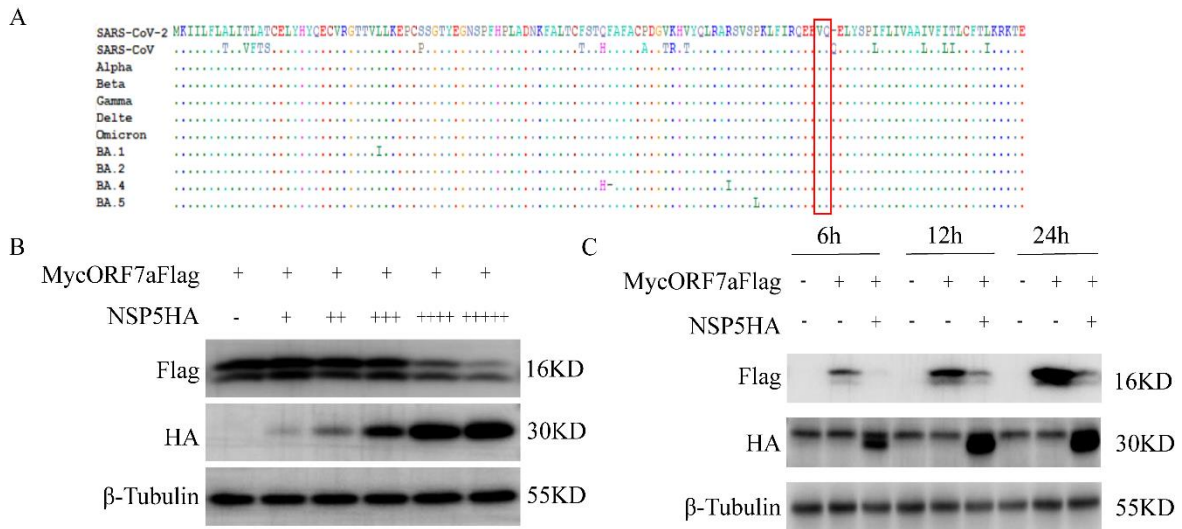


图 2.3 NSP5 对 ORF7a 的切割

Fig. 2.3 NSP5 cutting of ORF7a

注: A: 新冠病毒及其变异株中 ORF7a 的氨基酸序列比对图; B: ORF7a 和 NSP5 按一定比例转染到 HEK-293T 细胞, 48h 后收集蛋白; C: ORF7a 和 NSP5 共转染到 HEK-293T 细胞, 分别在 6h, 12h, 24h 收集蛋白, pcDNA3.1 作为空白对照。

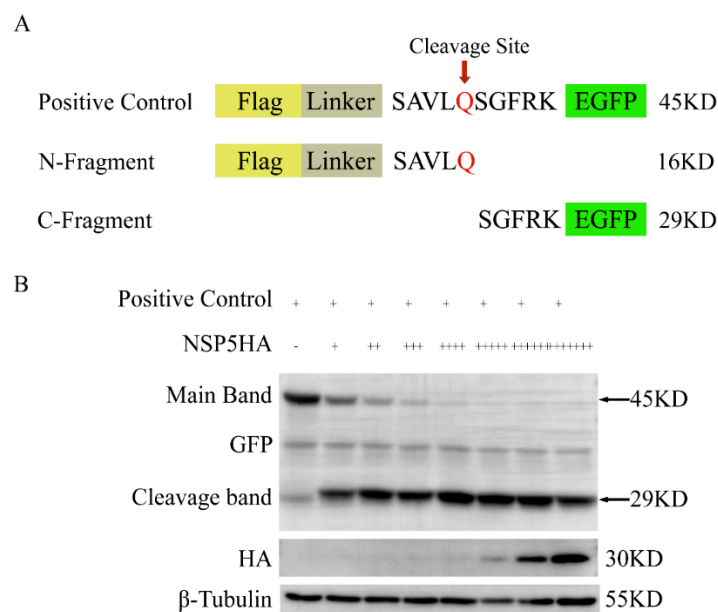


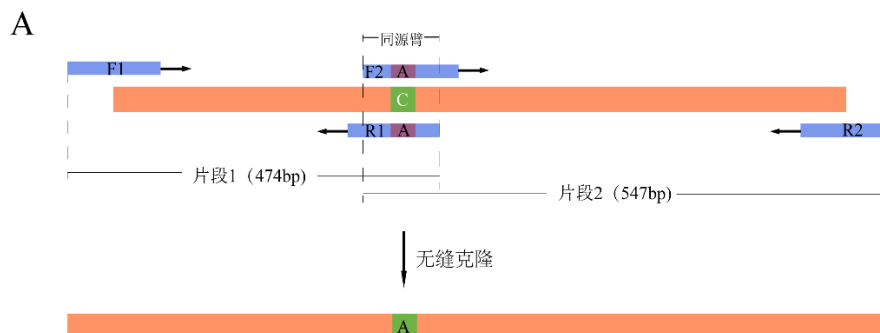
图 2.4 NSP5 对阳性对照的切割

Fig. 2.4 NSP5 cleavage of positive control

注：A：含 NSP4-5 序列的阳性对照示意图；B：阳性对照与 NSP5 按一定比例共转染到 HEK-293T 细胞中，48h 后收集蛋白。

2.4.4.2 新冠病毒 NSP5 C145 识别 ORF7a

新冠病毒 NSP5 第 145 位的半胱氨酸残基是其酶活性位点，对底物识别序列 P1 位置的谷氨酰胺具有偏好性，在上述实验中证实 NSP5 切割 ORF7a，为进一步确定第 145 位的半胱氨酸是否识别 ORF7a，将其突变为丙氨酸（A），通过无缝克隆构建 NSP5 的突变体 NSP5-C145A（图 2.5A 和 B），与上述实验相同，ORF7a 的量定为 1μg，NSP5-C145A 的量设为 0，0.33μg，0.5μg，1μg，2μg，3μg，剩余用 pcDNA3.1 空载补足到 4μg。Western blot 结果显示：随着 NSP5-C145A 的量的增加，ORF7a 的条带几乎不变（图 2.5C），说明 NSP5 的第 145 位的半胱氨酸识别 ORF7a，NSP5 切割 ORF7a。



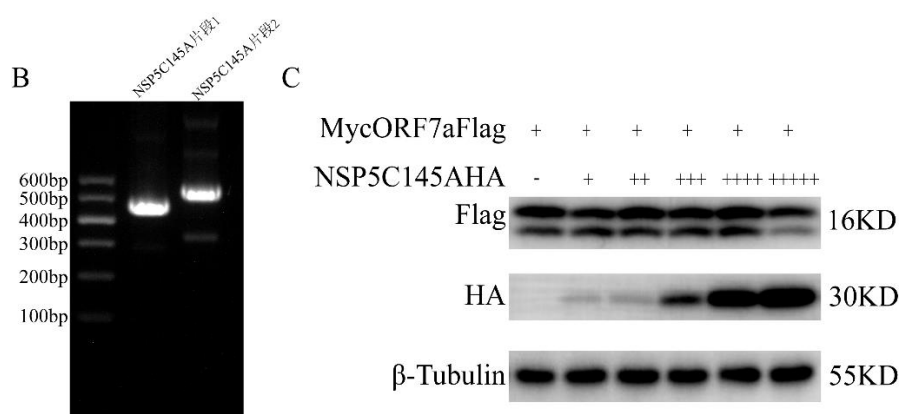


图 2.5 突变体 NSP5-C145A 对 ORF7a 的切割

Fig. 2.5 Mutant NSP5-C145A cleavage of ORF7a

注：A：NSP5-C145A 构建示意图，设计 F1 和 R1，F2 和 R2 2 对引物，克隆得到片段 1（474bp）和片段 2（547bp），经同源重组构建到 pcDNA3.1 上；B：NSP5-C145A 的片段 1 和片段 2 的核酸电泳图；C：ORF7a 与 NSP5-C145A 按一定比例共转染到 HEK-293T 细胞中，48h 后收集蛋白。

2.4.4.3 FRET 检测 NSP5 对 ORF7a 的酶切活性

将切割底物 mTFP1-ORF7a -Venus 定为 $1\mu\text{g}$ ，NSP5 设为 0, $0.33\mu\text{g}$, $0.5\mu\text{g}$, $1\mu\text{g}$, $2\mu\text{g}$, $3\mu\text{g}$ ，剩余用 pcDNA3.1 空载补足到 $4\mu\text{g}$ ，培养 48h 后从培养箱取出，去除原有的培养基，PBS 洗两次，1000rpm 离心 10min， $600\mu\text{l}$ PBS 重悬细胞并加到酶标板上，用酶标仪检测。结果显示，受体 Venus 在 528 nm 处出现峰值，并且随着 NSP5 的量的增加，528 nm 处的峰值逐渐降低，FRET 现象逐渐减弱。表明新冠病毒 NSP5 对 mTFP1-ORF7a -Venus 的 FRET 现象发挥抑制作用并存在剂量依赖性。

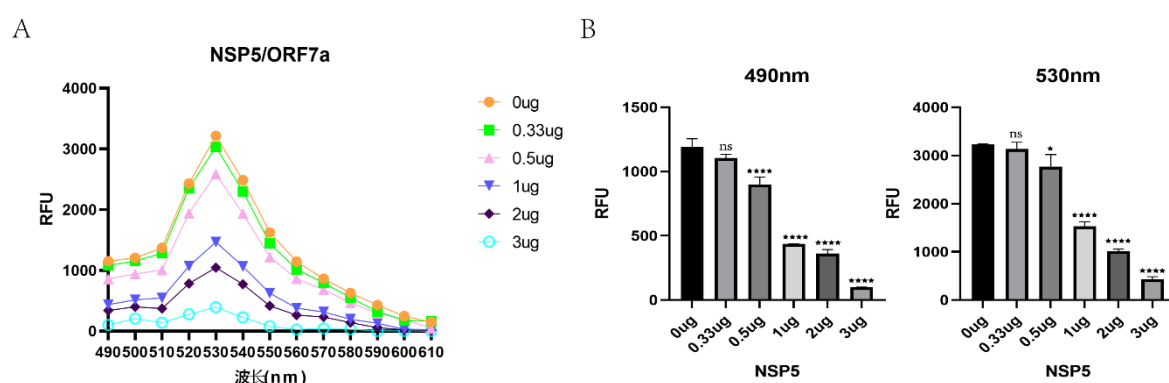


图 2.6 荧光能量共振转移 (FRET) 检测新冠病毒 NSP5 酶活性

Fig 2.6 Fluorescence resonance energy transfer (FRET) was used to detect the activity of SARS-CoV-2 NSP5 enzyme

注：A：酶标仪检测荧光能量共振转移现象；B：ORF7a 各波长的差异显著分析。

2.4.5 讨论与小结

新冠病毒 NSP5 是一种 3C 样蛋白酶也是主要蛋白酶，可以将病毒自身的多聚蛋白切割成多个非结构蛋白，有多篇研究报道了 NSP5 切割宿主内源蛋白，但未见报道 NSP5 切割新冠病毒的自身蛋白。在 NSP5 和 ORF7a 双质粒转染实验中，通过 Western Blot 观察到 NSP5 切割 ORF7a，并且随着 NSP5 的量增加，ORF7a 的表达量减少。在 6h, 12h, 24h 等时间点均能检测到 NSP5 切割 ORF7a，说明 NSP5 对 ORF7a 切割时间跨度长。NSP5-C145A 是 NSP5 功能失活突变体，随着 NSP5-C145A 的量的增加，ORF7a 的量并没有逐渐减少，进一步证明 NSP5 对 ORF7a 的切割。FRET 检测 NSP5 对 ORF7a 的酶切活性，结果显示，随着 NSP5 剂量的增加，FRET 现象逐渐减弱，说明 NSP5 切割 ORF7a 量逐渐增多，这与上述 Western Blot 结果一致。以上三个实验证实，新冠病毒 NSP5 对自身 ORF7a 具有切割作用。

综上，我们的研究首次发现了新冠病毒 NSP5 切割 ORF7a。

2.5 寻找新冠病毒 NSP5 切割 ORF7a 的产物

2.5.1 引言

上述研究发现 NSP5 切割 ORF7a，本章将致力于找到 NSP5 切割 ORF7a 后产生的切割产物，以及宿主内蛋白降解途径对切割过程是否产生影响。GC376 是一种广谱性冠状病毒 3C 样蛋白酶抑制剂，通过结合主蛋白酶催化活性位点抑制主蛋白酶发挥作用，可有效阻断许多动物和人类冠状病毒的增殖^[98-99]。

2.5.2 材料

2.5.2.1 细菌

E. coil DH5 α 和 E. coil BL21 菌株均为实验室自制。

2.5.2.2 细胞

人胚肾细胞 HEK293T 购自中国科学院北京细胞库。

2.5.2.3 质粒

为找到 NSP5 切割 ORF7a 的切割产物，我们分别在 ORF7a 的 N 端和 C 端设计了 GFP 标签，并构建 NSP5 和 ORF7a 的原核表达载体。所需质粒如下：

表 2.9 质粒种类

Tab. 2.9 The type of plasmids

质粒名称
pcDNA3.1-EGFP-myc-ORF7a-flag
pcDNA3.1-NSP5-HA
pcDNA3.1-myc-ORF7a-flag
pEGFPN1-myc-ORF7a-flag

2.5.2.4 试剂及耗材

表 2.10 实验试剂及耗材

Tab. 2.10 Experimental reagents and consumables

名称	厂家
胰蛋白胨, Yeast Extract, 氯化钠, Tris, Tricine, SDS, 甲叉双丙烯酰胺	生工生物工程（上海）有限公司
丙烯酰胺	成都市科隆化学品有限公司
咪唑, 尿素	Solarbio
0.45μm 滤器	上海安谱实验科技股份有限公司
Ni 层析介质 (NTA) Ni NTA Beads	北京博奥龙免疫技术有限公司

2.5.2.5 实验仪器

表 2.11 实验仪器

Tab. 2.11 Experimental instruments

仪器	厂家
PCR 仪	ABI
恒温摇床	Boygene
离心机	GENESPEED

2.5.2.6 试剂配制

表 2.12 试剂配制

Tab. 2.12 Reagent compounding

名称	配制方法
2YT 培养基	称取 3.2g 胰蛋白胨, 2g 酵母提取物, 1g 氯化钠, 溶于 200ml 超纯水, 灭菌
25mM 咪唑 Ni A 缓冲液	25mM Tris, 500mM NaCl, 25mM 咪唑, pH8.0
80mM 咪唑 Ni A 缓冲液	25mM Tris, 500mM NaCl, 80mM 咪唑, pH8.0
250mM 咪唑 Ni B 缓冲液	25mM Tris, 500mM NaCl, 250mM 咪唑, pH8.0
49.5%T3%C	称取 12g 丙烯酰胺, 0.375g 甲叉双丙烯酰胺, 加超纯水定容到 25ml, 0.45μm 滤器过滤
49.5%T5%C	称取 11.76g 丙烯酰胺, 0.619g 甲叉双丙烯酰胺, 加超纯水定容到 25ml, 0.45μm 滤器过滤
凝胶缓冲液	称取 9.1gTris, 加超纯水至 20ml, 调 pH 至 8.45, 加水定容至 25ml, 加入 0.075gSDS, 0.45μm 滤器过滤
阴极缓冲液	称取 6.055gTris, 8.958gTricine, 0.5gSDS, 超纯水定容至 500ml
阳极缓冲液	称取 12.11gTris, 加超纯水至 400ml, 调 pH 至 8.9, 定容至 500ml

2.5.3 方法

2.5.3.1 构建 ORF7a 系列突变体表达载体

设计引物, 扩增片段, 酶切载体, 连接, 方法同第二章 2.4.3.6。

表 2.13 引物信息

Tab. 2.13 Primer information

引物名称	引物序列 (5'-3')
EGFP-F	GTTTAAACTTAAGCTGCCACCATGGTGAGCAAGGG
EGFP-R	GATCAGCTTCTGCTCCTTGTACAGCTCGTCCATGC
EGFP-ORF7a-F	GACGAGCTGTACAAGGAGCAGAAGCTGATCAGCGA
EGFP-ORF7a-R	CTGGACTAGTGGATCTCATTGTGTCGTCGTCGTCTT
ORF7a-EGFP-F	CCCAAGCTTGCCACCATGGAGCAGAAG
ORF7a-EGFP-R	CGCGGATCCAATTTGTCGTCGTCGTCCTTT
ORF7aQ21A-1-F	TTTAAACTTAAGCTTGCCACCATGGAGCAGAAGCT
ORF7aQ21A-1-R	GCCTCTCACGCACTCGGCGTAGTGGTACAGCTCGCAGG
ORF7aQ21A-2-F	GAGCTGTACCACTACGCCGAGTGCGTGAGAGGCACCAC
ORF7aQ21A-2-R	TGGACTAGTGGATCCTCATTGTGTCGTCGTCGTCTT
ORF7aQ62A-1-R	GCAGGCAAATGCAAAGGCGGTGCTGAAGCAGGTCAGGG
ORF7aQ62A-2-F	ACCTGCTTCAGCACCGCCTTTGCATTTGCCTGCCCCGA
ORF7aQ76A-1-R	GCTTCTGGCTCTCAGGGCGTAAACGTGCTTCACGCCGT
ORF7aQ76A-2-F	GTGAAGCACGTTTACGCCCTGAGAGCCAGAAGCGTGTC
ORF7aQ90A-1-R	CTCTTGACCTCTTCGGCTCTGATGAAGAGCTTGGGGG
ORF7aQ90A-2-F	AAGCTCTTCATCAGAGCCGAAGAGGTGCAAGAGCTGTA
ORF7aQ94A-1-R	GGGGCTGTACAGCTCGGCCACCTCTTCTTGTCTGATGA
ORF7aQ94A-2-F	AGACAAGAAGAGGTGGCCGAGCTGTACAGCCCCATCTT

2.5.3.2 原核表达

- (1) 将构建好的原核表达载体转化到 BL21 感受态中，方法同第二章 2.4.3.5；
- (2) 挑单菌落，按抗生素：菌液：培养基=1：10：1000 的比例接种到 5ml 2YT 培养基中，37℃，220rpm 过夜培养，OD600 达到 1.1-1.2 后取出，加入 IPTG 至其终浓度为 0.25mg/ml，按照设置的不同条件诱导表达；
- (3) 将菌液 6500rpm，4℃离心 20min，去除上清，用 800μl 的 25mM 咪唑 NiA 缓冲液重悬菌沉淀，60W，2min，超声 2s 停 3s，超声破碎菌，13000rpm，4℃离心 30min，将上清转移到新的 EP 管中；
- (4) 取 800μl 的 25mM 咪唑 Ni A 缓冲液重悬包涵体沉淀，将上清和沉淀中分别取

出 80 μ l 样品，100℃煮样 10min，准备 SDS-PAGE 凝胶电泳；

（5）将结束电泳的 SDS-PAGE 凝胶经考马斯亮蓝染色并脱色后，观察并确定蛋白的最适表达条件。

2.5.3.3 蛋白纯化

（1）镍柱挂镍：所有溶液使用前均需 0.22 μ m 滤器过滤，注意镍柱应时刻浸没在溶液内而不使其干燥，用三倍柱体积的 NaOH 除菌，三倍柱体积的灭菌水清洗，硫酸镍过夜浸泡，三倍柱体积的灭菌水清洗；

（2）平衡镍柱：用三倍柱体积的 25mM 咪唑 Ni A 缓冲液平衡镍柱；

（3）流穿：将蛋白溶液注入管内并重悬镍柱，静置 5-10min，使蛋白与镍柱充分结合，下端插针头控制流速。将流出的蛋白溶液再流穿一次镍柱，提高结合效率；

（4）洗杂：加入 1/2 柱体积的 80mM 咪唑 Ni A 缓冲液，静置 5-10min，流出，如此洗涤两次；

（5）洗脱：加入 1/2 柱体积的 250mM 咪唑 Ni B 缓冲液，静置 5-10min，流出，如此洗脱三次。用 250mM 咪唑 Ni B 缓冲液注满管，储存于 4℃；

（6）将蛋白溶液，流穿液，洗杂，洗脱的样品分别取出 80 μ l 煮样，进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，经考马斯亮蓝染色并脱色后，观察目的蛋白是否正确表达。将洗脱的三管目的蛋白超滤浓缩，分装，经液氮速冻后保存到-80 冰箱。

2.5.3.4 包涵体复性

（1）方法一：

a. 将包涵体沉淀用裂解液（50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2 mM DTT; 5 mM benzamidine-HCl; 2 mM EDTA）洗涤三次，然后用纯水洗涤；

b. 将包涵体沉淀用溶解液（6 M 盐酸胍; 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM DTT）在室温溶解 1 小时，可每隔 10min 涡旋一次，离心留上清去除不溶物，上清即为蛋白溶液；

c. 测上清蛋白浓度，将上清液用冰折叠液（50 mM Tris-HCl, pH 8.5; 1 mM MgSO₄; 1 mM DTT; 5%甘油）稀释到 50 μ g/ml，4℃过夜孵育；

d. 边搅拌边滴加饱和硫酸铵，静置 1-2 小时，13000rpm，4℃离心 30min，去除上清，蛋白质沉淀溶于 20mM HEPES 中。

（2）方法二：

- a.重悬包涵体沉淀于 10ml 洗涤缓冲液（50mM Tris, 500mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton X-100, 10%甘油, pH8.0），超声溶解（400W, 超 1s 停 1s, 5min）；4℃, 8000rpm, 离心 30min;
- b.弃上清, 重悬沉淀于 10ml 洗涤缓冲液, 37℃孵育过夜; 超声溶解（400W, 超 1s 停 1s, 5min）, 4℃, 8000rpm, 离心 30min;
- c.弃上清, 重悬沉淀于 10ml 洗涤缓冲液, 室温孵育 30min; 超声溶解（400W, 超 1s 停 1s, 5min）, 4℃, 8000rpm, 离心 30min, 得到纯净的包涵体;
- d.弃上清, 重悬沉淀于 20ml 包涵体溶解缓冲液（50mM Tris, 500mM NaCl, 2M 尿素, 1mM PMSF pH8.0）;
- e.将重悬的包涵体分成 11 份, 分别调节缓冲液 pH 值到 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0, 13.0, 分别超声溶解（400W, 超 1s 停 1s, 1min）, 4℃, 8000rpm 离心 30min;
- f.分别取超声溶解后的上清液 20 μ l 进行 SDS-PAGE 分析, 观察哪个溶解度下包涵体溶解的量, 筛选出包涵体温和溶解的最适酸碱度;
- g.在 4℃, 溶解的包涵体溶液加入复性缓冲液（50mM Tris, 500mM NaCl, 2M 尿素, 0.5mM EDTA, 1% Triton X-100, 10%甘油, 1mM PMSF pH8.0）缓慢稀释（0.5ml/min）至缓冲液 pH 为 8.0, 并不断搅拌; 复性好的包涵体用 0.22 μ m 滤膜过滤使其澄清。

（3）方法三:

- a.将诱导表达的菌液 4℃, 6500rpm 离心 20min, 去上清, 将菌体沉淀重悬于 20ml 裂解缓冲液（20mM Tris-HCl, 1mM PMSF, 细菌蛋白酶抑制剂 Cocktail, pH8.0）, 超声破碎（200W, 超 2s 停 3s, 10min）;
- b.将溶液 4℃, 12000rpm 离心 20min, 去上清, 留包涵体沉淀, 使用包涵体洗涤液（20mM Tris, 1mM EDTA, 2M 尿素, 1M NaCl, 1%Triton X-100, pH8.0）洗涤 3 次;
- c.使用包涵体溶解液（20mM Tris, 5mM DTT, 8M 尿素, pH8.0）溶解包涵体, 并在 4℃过夜溶解, 在 4℃, 15000rpm 离心 15min, 留上清;
- d.在包涵体溶解液中逐步滴加 20mM Tris, pH8.0 缓冲液, 缓慢搅拌至尿素浓度达到 0.5M 后, 将蛋白溶液装入透析袋, 于 4℃在 20mM PBS, pH7.4 中透析过夜, 进行 SDS-PAGE 分析。

2.5.4 实验结果

2.5.4.1 GC376 对 NSP5 切割 ORF7a 的影响

为研究 ORF7a 的切割是否与宿主蛋白酶有关以及找到切割产物，我们加入了 GC376，它是一种广谱的 3C 样蛋白酶抑制剂。将阳性对照设定为 2 μ g，NSP5 设为 0, 0.0125 μ g, 0.025 μ g, 0.05 μ g, 0.075 μ g, 0.1 μ g, 0.2 μ g, 0.4 μ g, 剩余用空载补足到 4 μ g, 6-8h 换液时加入 GC376，使其终浓度为 50 μ M。Western blot 结果显示：不加 GC376 时，随着 NSP5 量的增加，阳性对照主带逐渐减少，切割产物也随之增加；加入 GC376 后，主带虽仍减少，但相比未加 GC376 的有所回升，切割产物也增多，说明 GC376 对 NSP5 切割阳性对照产生抑制作用（图 2.7）。为研究 GC376 对 NSP5 切割 ORF7a 的影响以及寻找切割产物，分别在 ORF7a 的 N 端和 C 端构建 EGFP 标签（图 2.8A 和 B），设计对照组和 GC376 处理组，ORF7a 定为 1 μ g，NSP5 设为 0, 0.045 μ g, 0.09 μ g, 0.18 μ g, 0.37 μ g, 0.75 μ g, 1.5 μ g, 3 μ g，其余用空载补足到 4 μ g。Western blot 结果显示：随着 NSP5 量的增加，GC376 处理组的 ORF7a 主带有所回升（图 2.8C 和 D），说明 GC376 对 NSP5 切割 ORF7a 产生抑制作用。

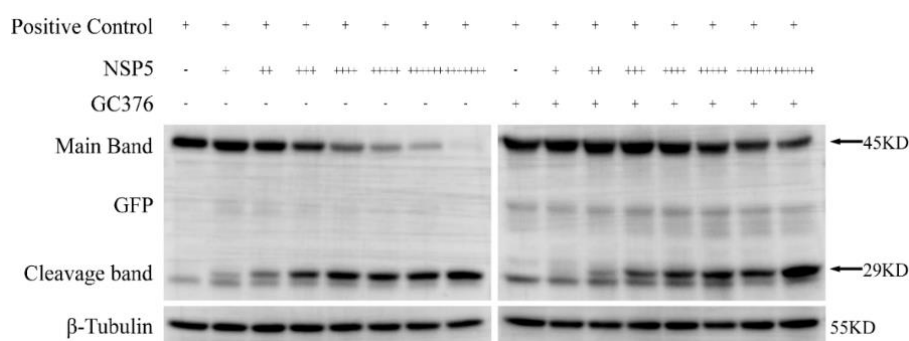
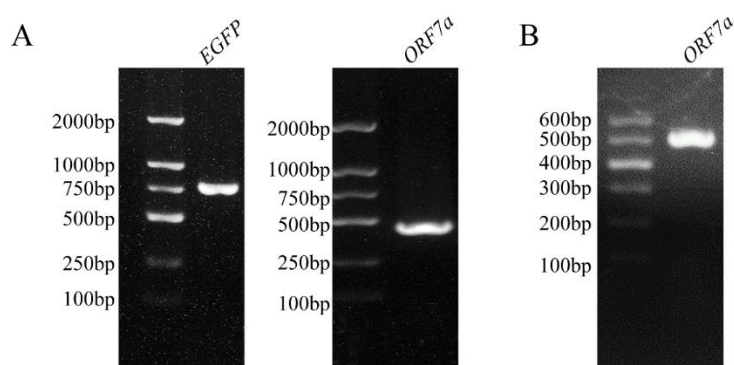


图 2.7 NSP5 对阳性对照的切割

Fig. 2.7 NSP5 cleavage of positive control



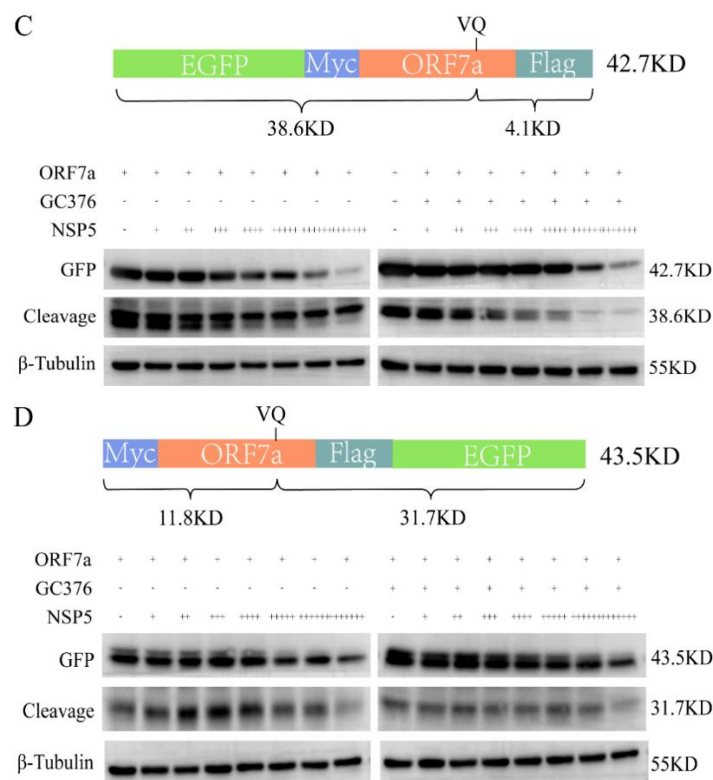


图 2.8 NSP5 对 ORF7a 的切割

Fig. 2.8 S NSP5 cutting of ORF7a

注：A：利用无缝克隆技术将 EGFP（753bp）和 ORF7a（447bp）克隆到 pcDNA3.1 上；B：利用无缝克隆技术将 ORF7a（453bp）克隆到 pEGFPN1 载体上；C：NSP5 与 ORF7a（EGFP 在 N 端）按一定比例共转染到 HEK-293T 细胞中，48h 收集蛋白；D：NSP5 与 ORF7a（EGFP 在 C 端）按一定比例共转染到 HEK-293T 细胞中，48h 收集蛋白。

2.5.4.2 蛋白降解途径对 NSP5 切割 ORF7a 的影响

为排除宿主蛋白降解的作用，从蛋白酶体，溶酶体和 caspase 三个途径检验对 NSP5 切割 ORF7a 的影响。MG132 是一种可逆的蛋白酶体抑制剂，其细胞最小致死浓度定为 7.5 μ M（图 2.9A）；BafA1 可以阻断自噬体和溶酶体的融合，其细胞最小致死浓度定为 12.5nM（图 2.9C）；Z-VAD-FMK 是一种 caspase 抑制剂，其细胞最小致死浓度定为 50 μ M。ORF7a 定为 1 μ g，NSP5 设为 0, 0.33 μ g, 0.5 μ g, 1 μ g, 2 μ g, 3 μ g，剩余用空载补足到 4 μ g，在 6-8h 换液时加入抑制剂，工作 48h 后收集蛋白。Western blot 结果显示：随着 NSP5 量的增加，ORF7a 主带逐渐减小（图 2.9B, D, E），说明蛋白酶体，溶酶体和 caspase 途径对 NSP5 切割 ORF7a 无明显影响。

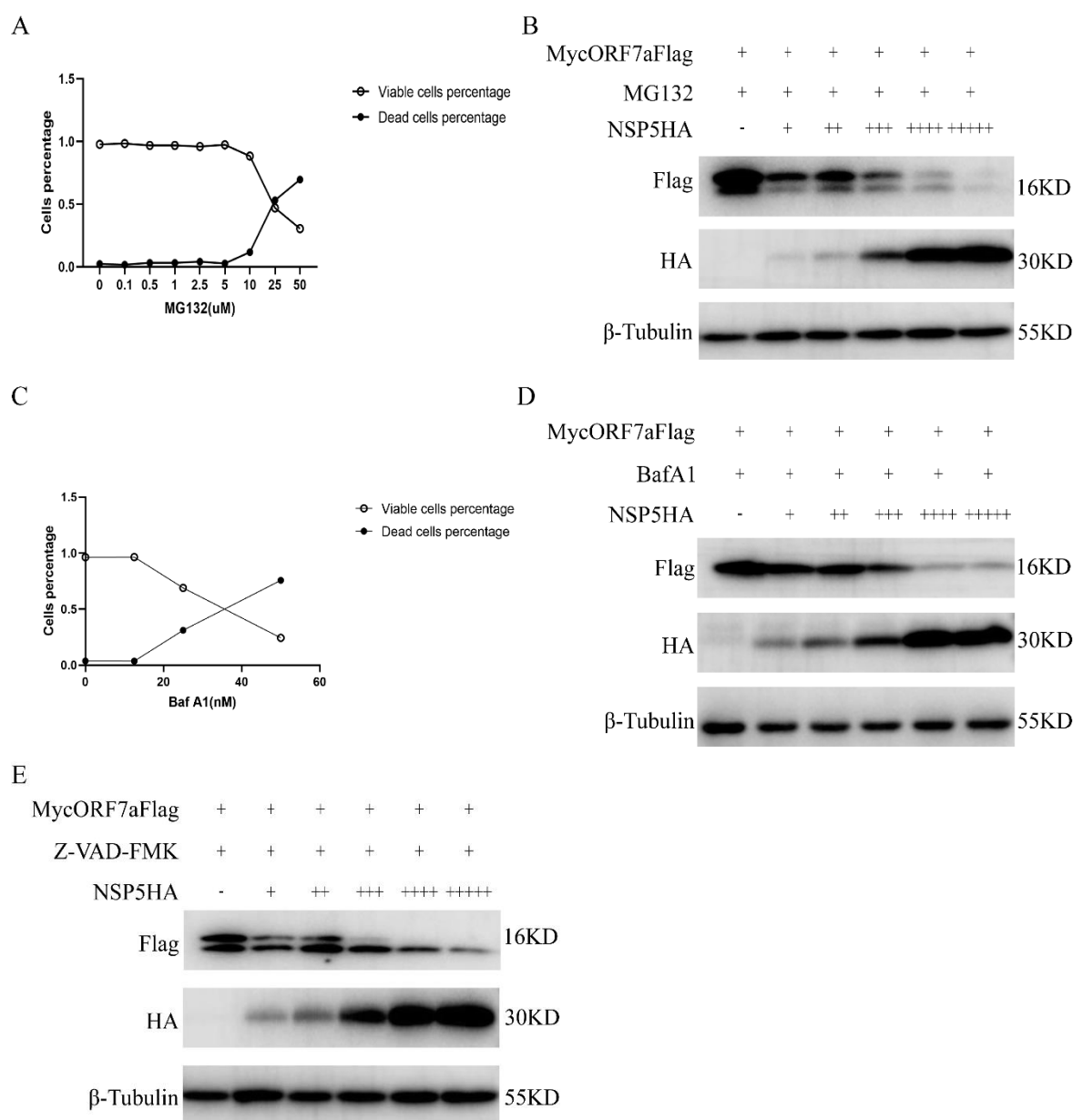


图 2.9 蛋白降解途径对 NSP5 切割 ORF7a 的影响

Fig. 2.9 The effect of protein degradation pathway on NSP5 cleavage of ORF7a

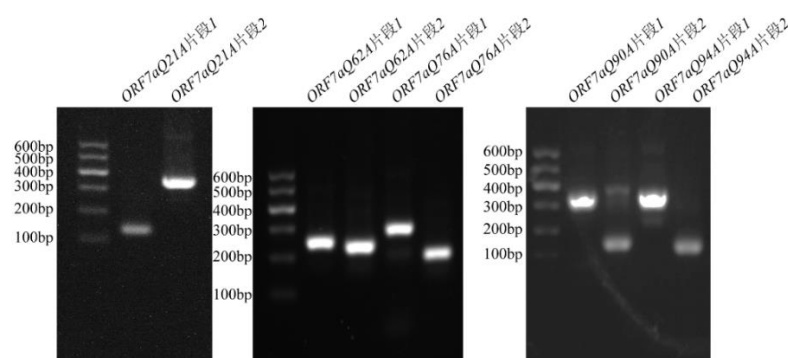
注：A：摸索 MG132 最小致死浓度，其浓度定为 7.5μM；B：ORF7a 与 NSP5 按一定比例共转染到 HEK-293T 细胞时，加入 MG132，48h 收集蛋白；C：摸索 Baf A1 最小致死浓度，其浓度定为 12.5nM；D：ORF7a 与 NSP5 按一定比例共转染到 HEK-293T 细胞时，加入 Baf A1，48h 收集蛋白；E：ORF7a 与 NSP5 按一定比例共转染到 HEK-293T 细胞时，加入 Z-VAD-FMK，48h 收集蛋白。

2.5.4.3 ORF7a 含有 NSP5 其他潜在识别位点

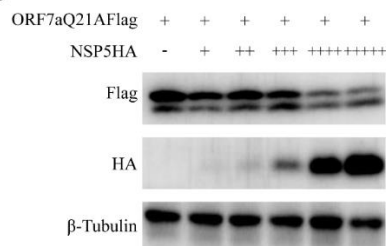
进一步研究 NSP5 对 ORF7a 的具体切割位点，将谷氨酰胺（Q）突变为丙氨酸

(A), 构建 ORF7a 系列突变体 ORF7aQ21A, ORF7aQ62A, ORF7aQ76A, ORF7aQ90A, ORF7aQ94A (图 2.10A)。将 ORF7a 定为 1 μ g, NSP5 设为 0, 0.33 μ g, 0.5 μ g, 1 μ g, 2 μ g, 3 μ g, 剩余用空载补足到 4 μ g, 48h 收集蛋白。Western blot 结果显示: 随着 NSP5 量的增加, ORF7aQ21A, ORF7aQ76A 对 NSP5 切割有影响, 但未能完全阻止 NSP5 对 ORF7a 的切割 (图 2.10B, C, D, E, F, G)。根据最新证实的谷氨酸 (E) 也是 NSP5 识别位点的报道, 我们进一步合成了谷氨酰胺和谷氨酸的突变体 ORF7aQEmu, 结果显示未能完全阻止 NSP5 对 ORF7a 的切割 (图 2.10H), 提示 NSP5 对 ORF7a 具有复杂切割位点, 需进一步研究挖掘所有 NSP5 识别切割序列。

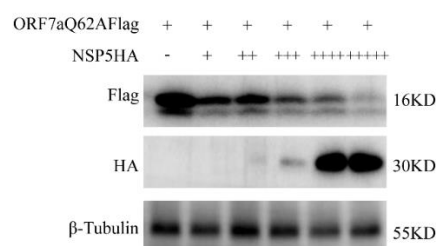
A



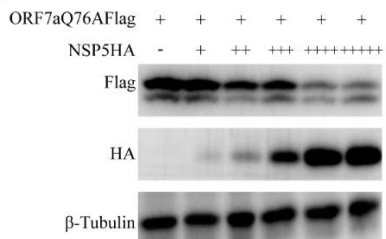
B



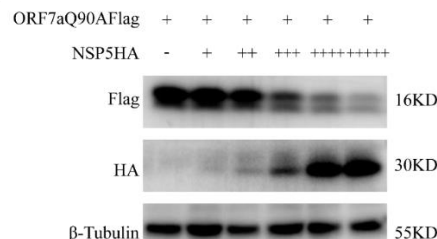
C



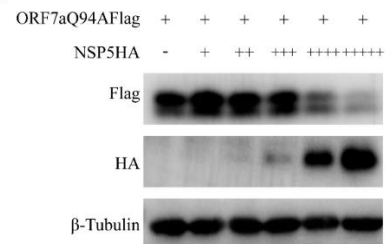
D



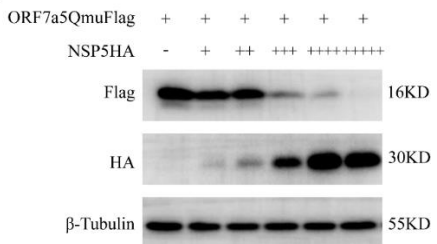
E



F



G



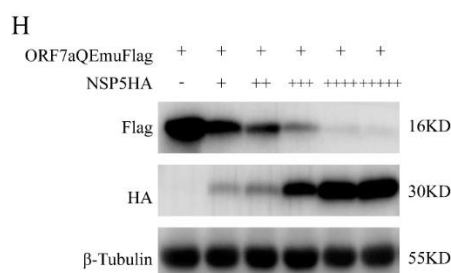


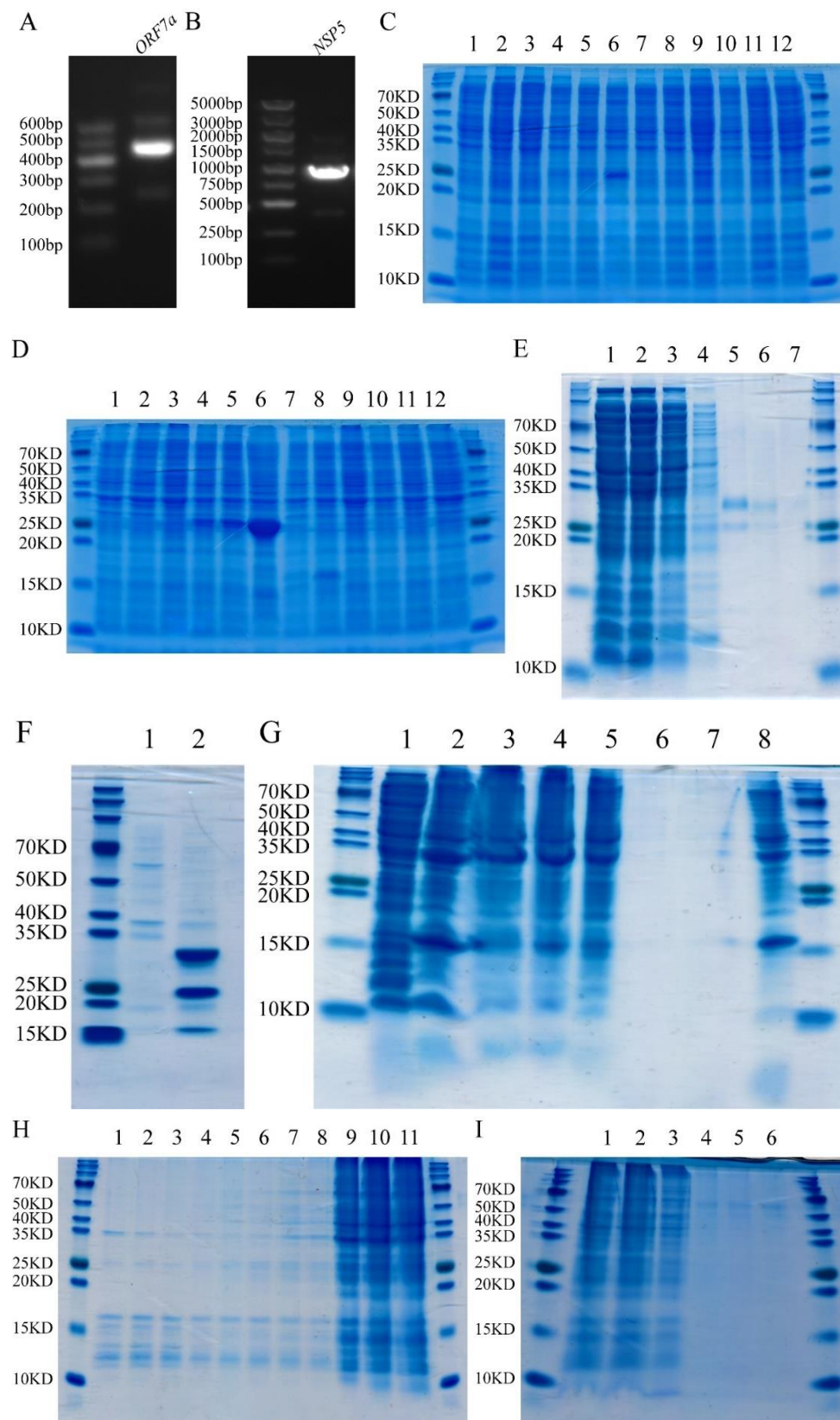
图 2.10 ORF7a 含有 NSP5 其他潜在识别位点

Fig. 2.10 ORF7a contains other potential recognition sites of NSP5

注：A：ORF7aQ21A 片段 1 为 129bp，片段 2 为 360bp；ORF7aQ62A 片段 1 为 252bp，片段 2 为 237bp；ORF7aQ76A 片段 1 为 294bp，片段 2 为 195bp；ORF7aQ90A 片段 1 为 336bp，片段 2 为 153bp；ORF7aQ94A 片段 1 为 348bp，片段 2 为 141bp；B：ORF7aQ21A 和 NSP5 按一定比例共转染到 HEK-293T 细胞中，48h 收集蛋白；C：ORF7aQ62A 和 NSP5 按一定比例共转染到 HEK-293T 细胞中，48h 收集蛋白；D：ORF7aQ76A 和 NSP5 按一定比例共转染到 HEK-293T 细胞中，48h 收集蛋白；E：ORF7aQ90A 和 NSP5 按一定比例共转染到 HEK-293T 细胞中，48h 收集蛋白；F：ORF7aQ94A 和 NSP5 按一定比例共转染到 HEK-293T 细胞中，48h 收集蛋白；G：ORF7a5Qmu 和 NSP5 按一定比例共转染到 HEK-293T 细胞中，48h 收集蛋白；H：ORF7aQEmu 和 NSP5 按一定比例共转染到 HEK-293T 细胞中，48h 收集蛋白。

2.5.4.4 ORF7a 和 NSP5 原核表达情况

为得到纯化的 ORF7a 和 NSP5 蛋白进行无细胞酶切，我们将 ORF7a 和 NSP5 克隆到 pCzn1 原核表达载体上（图 2.11A 和 B），转化到 BL21 感受态中，加入 IPTG 使其工作浓度为 0.25mM，设置三组表达条件：（1）11℃，180rpm，12h；（2）16℃，180rpm，12h；（3）37℃，220rpm，4h。每组包含 BL21（阴性对照），OYA（阳性对照），ORF7a，NSP5 这四种类别。超声破碎 60W，2min，超声 2s 停 3s，13000rpm，4℃离心 30min，分别收集上清和沉淀。SDS-PAGE 胶显示：NSP5 在 16℃，180rpm，12h 条件下表达在上清中（图 2.11C）；ORF7a 在 16℃，180rpm，12h 条件下表达在包涵体沉淀中（图 2.11D）。将 NSP5 蛋白溶液过镍柱纯化后（图 2.11E），再用 50KD 和 10KD 超滤管浓缩，得到纯化的 NSP5 蛋白（图 2.11F）。ORF7a 包涵体尝试方法一复性，得到的蛋白仍不可溶（图 2.11G）。ORF7a 包涵体尝试方法二复性，得到其温和溶解最适酸碱度为 pH11（图 2.11H），缓慢加入复性液后过镍柱，发现 ORF7a 的 His 标签几乎不与镍离子结合（图 2.11I），说明其 His 标签没有完全暴露出来。ORF7a 包涵体尝试方法三复性，发现 ORF7a 的 His 标签可以与镍柱结合，但需要进一步调整洗杂和洗脱的咪唑浓度（图 2.11J 和 K）。



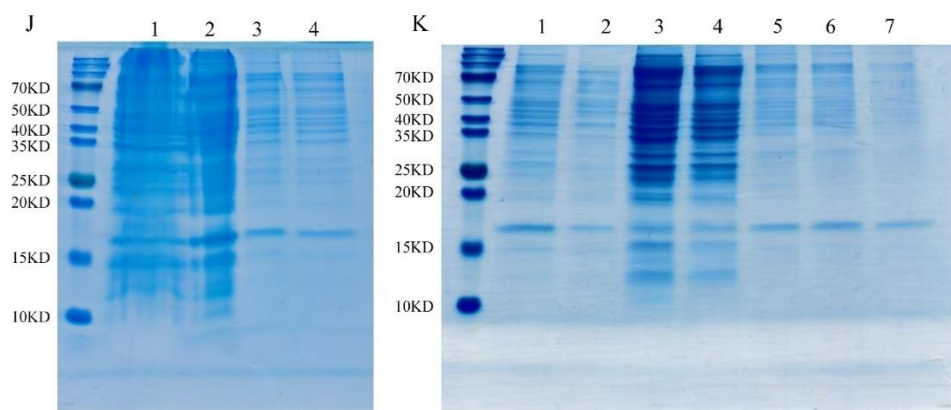


图 2.11 ORF7a 和 NSP5 原核表达情况

Fig. 2.11 Prokaryotic expression of ORF7a and NSP5

注：A：ORF7a 核酸片段为 465bp，蛋白为 17KD；B：NSP5 核酸片段为 999bp，蛋白为 30KD；C：上清，1.BL21，11℃；2. BL21，16℃；3. BL21，37℃；4.OYA，11℃；5. OYA，16℃；6. OYA，37℃；7.ORF7a，11℃；8. ORF7a，16℃；9. ORF7a，37℃；10.NSP5，11℃；11. NSP5，16℃；12. NSP5，37℃；D：沉淀，上样顺序与 C 一致；E：1.NSP5 上清；2.流穿液；3.第一次洗杂蛋白；4. 第二次洗杂蛋白；5.第一次洗脱；6. 第二次洗脱；7. 第三次洗脱；F：1.50KD 超滤管内管；2. 30KD 超滤管内管；G：1.ORF7a 上清；2.ORF7a 包涵体沉淀；3.包涵体洗涤；4.包涵体溶解；5.溶解后上清；6.复性；7.硫酸铵沉淀；8.沉淀离心后加入 HEPES；H：ORF7a 包涵体溶解酸碱度 pH3-13；I：1.ORF7a 复性后；2.流穿液；3.洗杂蛋白；4. 第一次洗脱；5. 第二次洗脱；6. 第三次洗脱；J：1.ORF7a 包涵体沉淀；2.包涵体溶于 8M 尿素；3.包涵体溶于 0.5M 尿素；4.包涵体透析溶于 PBS；K：1.包涵体透析溶于 PBS；2.流穿液；3.第一次洗杂蛋白；4. 第二次洗杂蛋白；5.第一次洗脱；6. 第二次洗脱；7. 第三次洗脱。

2.5.4.5 ORF7a 的小分子切割产物

因上述实验未能明显观察到 NSP5 切割 ORF7a 产生的小分子切割产物，所以设置 3 个 10cm 皿，每个皿 ORF7a 为 5.75μg，NSP5 按 1：3，1：1，3：1 即 1.9μg，5.75μg，17.25μg 共转染 293T 细胞，48h 后用 RIPA 裂解细胞，离心收集蛋白后用 3KD 超滤管超滤，将外管的蛋白收集并浓缩到一定体积，进行尿素胶电泳。结果显示，在 3.5KD-10KD 之间观察到 NSP5 切割 ORF7a 产生的小分子切割产物。

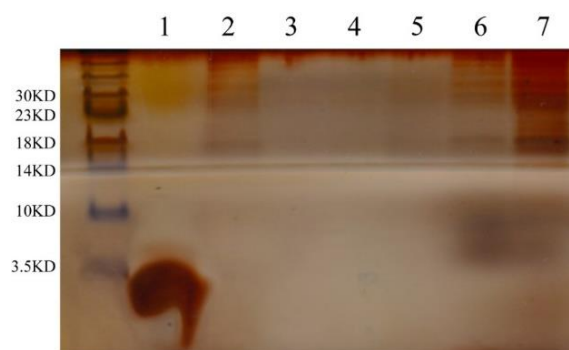


图 2.12 ORF7a 的小分子切割产物

Fig. 2.12 The small molecule cleavage products of ORF7a

注：1.3×Flag（阳性对照）；2.ORF7a；3.NSP5（1：3）；4.NSP5（1：1）；5.NSP5（3：1）；6.NSP5+ORF7a（1：3）；7. NSP5+ ORF7a（1：1）。

2.5.5 讨论与小结

本小节首先探究了 GC376 对 NSP5 切割阳性对照这一过程产生抑制作用，分别在 ORF7a 的 N 端和 C 端带上 GFP 标签后，GC376 处理组的 ORF7a 主带有所回升，但切割条带逐渐减少，提示我们 ORF7a 含有复杂的切割位点，且宿主中可能含有 NSP5 的同功酶。进一步研究 NSP5 对 ORF7a 的具体切割位点，构建了 ORF7a 潜在切割位点系列突变体，与 NSP5 双质粒共转染实验的结果显示，Q21，Q76 位点的突变对 NSP5 的切割有影响，但未能阻止 NSP5 对 ORF7a 的切割。参考最新证实的谷氨酸（E）位点也是 NSP5 识别位点的报道，我们进一步构建了 ORF7a 的 Q 与 E 的突变体，结果显示未能完全阻止 NSP5 对 ORF7a 的切割，提示 NSP5 对 ORF7a 具有复杂切割位点，需进一步研究挖掘所有 NSP5 识别切割序列。为进行无细胞酶切，成功纯化 NSP5 蛋白，ORF7a 包涵体溶解液可与镍柱结合，但洗杂和洗脱条件需进一步调整。将 ORF7a 和 NSP5 共转后的蛋白裂解液超滤，尿素胶观察到 NSP5 切割 ORF7a 产生的小分子切割产物，但不能确定其分子量和氨基酸序列，需进一步验证。

2.6 新冠病毒 NSP5 切割 ORF7a 的功能研究及其产物与宿主的互作鉴定

2.6.1 引言

以上内容证实新冠病毒 NSP5 切割 ORF7a，切割对 ORF7a 产生怎样的影响以及切割产物发挥怎样的功能是本章重点研究的内容。为此，通过免疫荧光技术，观察 ORF7a 被 NSP5 切割前后的亚细胞定位，以及通过生物素-链亲和素标记细胞膜蛋白

的方法研究 NSP5 对 ORF7a 细胞膜定位的影响。除此以外，通过体外 T 细胞激活实验研究被切割后的 ORF7a 以及产生的切割产物对 T 细胞激活的影响。

为了找到与 NSP5 切割 ORF7a 的切割产物相互作用的宿主蛋白，我们利用亲和纯化质谱联用技术（IP-MS）进行研究，通过磁珠富集目的蛋白，进行质谱分析。经过数据分析，得到候选基因，构建其真核表达载体，并通过免疫共沉淀技术进行鉴定。

2.6.2 材料

2.6.2.1 细菌

E. coli DH5 α 菌株均为实验室自制。

2.6.2.2 细胞

人胚肾细胞 HEK293T 和人 T 淋巴细胞 Jurkat 均购自中国科学院北京细胞库。

2.6.2.3 质粒

本章构建及所需质粒如下：

表 2.14 质粒种类

Tab. 2.14 The type of plasmid

质粒名称
pcDNA3.1
pcDNA3.1-EGFP-myc-ORF7a-flag
pcDNA3.1-myc-ORF7a-flag
pcDNA3.1-NSP5-HA
pcDNA3.1-myc-N-flag
pcDNA3.1-myc-ORF8-flag
pcDNA3.1-H2BC12-HA
pcDNA3.1-RPS5-HA
pcDNA3.1-IDH1-HA
pcDNA3.1-PHB2-HA
pcDNA3.1-NPM1-HA

2.6.2.4 试剂及耗材

表 2.15 实验试剂及耗材

Tab. 2.15 Experimental reagents and consumables

名称	厂家
爬片 (ϕ 14 mm), 24 孔板	NEST
1640 培养基	Gibco
4%PFA 固定液	Biosharp
Flag 标签抗体	Proteintech
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ Plus 594, ANTI-HM CD3 SK7 APC, ANTI-HM CD69 FN50 FITC, ANTI-HM CD25 BC96 PE, ANTI-HM CD3 OKT3 FG PMR, ANTI-HM CD28 CD28.2 FG PMR, 7-AAD Viability Staining Solution, EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, Neutravidin Ultralink	中国赛默飞世尔科技有限公司
IPKine™ Anti-DDDDK Magnetic IP Kit, IPKine™ Anti-Myc Magnetic IP Kit	武汉亚克因生物技术有限公司
Trizol	Ambion
无水乙醇	天津市北辰方正试剂厂
HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper)	Vazyme
Ex Taq	TaKaRa
琼脂糖	BIOWEST
Cocktail	MCE
无酶无菌水, 牛血清白蛋白粉末, DAPI, 明胶封片剂	Solarbio
DNA marker	上海生工生物工程股份有限公司

2.6.2.5 实验仪器

表 2.16 实验仪器

Tab. 2.16 Experimental instruments

仪器	品牌
激光共聚焦	ZEISS
流式细胞仪	BD
磁力架, 金属浴	Monad
PCR 仪	ABI
微波炉	Galanz
琼脂糖凝胶电泳仪	北京六一生物科技有限公司
紫外凝胶分析仪	Boygene
真空离心浓缩仪	Eppendorf

2.6.2.6 试剂配制

表 2.17 试剂配制

Tab. 2.17 reagent compounding

名称	配制方法
FACS	称取 0.5gBSA 溶于 50mlPBS, 0.22 μ m 无菌滤器过滤
DPBS	称取 0.2 g CaCl ₂ , 0.4 g KCl, 0.4 g KH ₂ PO ₄ , 0.2 g MgCl ₂ ·6H ₂ O, 16 g NaCl, 4.32 g Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O, 溶于 2L ddH ₂ O
LB1 缓冲液	50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
LB2 缓冲液	在 LB1 缓冲液中加入 1% (w/v)的 Triton X-100, 将溶液在低温低速下涡旋溶解 1 小时
LB3 缓冲液	使用前, 每 10ml LB2 缓冲液中添加 1 片蛋白酶抑制剂 Cocktail
SWS 缓冲液	PBS 中加入 0.1% Triton X-100, 350 mM NaCl, 5 mM EDTA

2.6.3 方法

2.6.3.1 细胞免疫荧光

(1) 在 24 孔板中提前加入 400 μ l 培养基, 将爬片放入孔底, 并轻轻按压排除气泡, 使其与孔底完全贴合, 取 1×10^5 个细胞缓慢加入孔中, 贴壁后进行转染, 培养 48h 后从培养箱取出;

(2) 去除培养基, 取 500 μ l PBS 清洗 5min, 清洗 3 次;

(3) 取 500 μ l 4%PFA 固定 30min-1h, PBS 清洗 3 次;

(4) 取 500 μ l 0.5%Triton-100 通透 25min, PBS 清洗 3 次;

(5) 取 500 μ l 1%BSA 在 37 $^{\circ}$ C 培养箱封闭 1h;

(6) 1%BSA 按照说明书比例稀释一抗, 取 200 μ l 加入孔中覆盖细胞, 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育;

(7) 取 500 μ l PBST 清洗 5min, 清洗 3 次, 1%BSA 按照说明书比例稀释荧光二抗, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1h, PBST 清洗 3 次;

(8) 取 200 μ l DAPI 染色细胞核, 孵育 5min, PBST 清洗 3 次;

(9) 在载玻片上滴加封片剂并预热到 60 $^{\circ}$ C, 从培养孔中取出爬片, 盖到载玻片上, 注意不要有气泡, 共聚焦下通过 DAPI 和 594 通道观察并采集图片。

2.6.3.2 质谱数据分析

质谱数据筛选标准: NSP5 和 ORF7a 共转的 iBAQ 值与 pcDNA3.1 和 ORF7a 共转的 iBAQ 值的比值大于 1, iBAQ 值大于 100, 并扣除高的 pcDNA3.1 空载的 iBAQ 值, 其余为 NSP5 切割 ORF7a 的切割产物的潜在互作蛋白。

2.6.3.3 构建候选互作基因表达载体

(1) 提取 HEK-293T 细胞的 RNA, 使用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA;

(2) 设计 PCR 引物:

表 2.18 PCR 引物信息

Tab. 2.18 PCR primer information

引物 名称	引物序列(5'-3')
IGKV2D -29-F	ACCGAGCTCGGATCCATGAGGCTCCCTGCTCAGCT
IGKV2D -29-R	GACTCGAGCGGCCGCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAAGGAAGCTGTATACTTTGC

续表 2.18 PCR 引物信息

Continued Tab. 2.18 PCR primer information

引物 名称	引物序列(5'-3')
H2BC12 -F	ACCGAGCTCGGATCCATGCCGGAACCAGCGAAGTC
H2BC12 -R	GACTCGAGCGGCCGCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACTTAGCGCTGGTGTACTTG
RPS5-F	ACCGAGCTCGGATCCATGACCGAGTGGGAGACAGC
RPS5-R	GACTCGAGCGGCCGCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGCGGTTGGACTTGGCCACA C
PHB2-F	ACCGAGCTCGGATCC ATGGCCCAGAACTTGAAGGA
PHB2-R	GACTCGAGCGGCCGCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATTCTTACCCTTGATGAGGC
PGAM5- F	ACCGAGCTCGGATCCATGGCGTTCCGGCAGGCGCT
PGAM5- R	GACTCGAGCGGCCGCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGGATCGAGTGATCTTGTCG G
NPM1-F	ACCGAGCTCGGATCCATGGAAGATTCGATGGACAT
NPM1-R	GACTCGAGCGGCCGCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAAAGAGACTTCCTCCACTGC C
ALB-F1	ACCGAGCTCGGATCC ATGAAGTGGGTAACCTTTAT
ALB-R1	TTTTTCCAACAGAGGTTTTTACAGCATTCTTCA
ALB-F2	CCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGT
ALB-R2	GACTCGAGCGGCCGCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATAAGCCTAAGGCAGCTTGA C
IDH1-F	ACCGAGCTCGGATCCATGTCCAAAAAAATCAGTGG
IDH1-R	GACTCGAGCGGCCGCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAAAGTTTGGCCTGAGCTAGT T

(3) 扩增片段, 酶切载体, 连接, 方法同第二章 2.4.3.6。

2.6.3.4 生物素-链亲和素标记细胞膜蛋白

全程在冰上处理，以 HEK-293T 细胞为例：

- (1) 在 35mm 培养皿中接种 2×10^5 个细胞，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；
- (2) 从培养箱中取出细胞，去除原有培养基，取 1ml DPBS 清洗细胞两次；
- (3) 加入 400 μ l 生物素溶液(生物素溶于 DPBS 中浓度为 2.5 mg/ml)，在冰上缓慢孵育 30min；
- (4) 取 1ml 100mM 甘氨酸溶液（DPBS 配制）孵育 5min，孵育三次；
- (5) 取 1 ml 20 mM 甘氨酸溶液（DPBS 配制）孵育 5min，孵育三次；
- (6) 取 200 μ l LB3 缓冲液到孔中，用细胞刮刀分离细胞，将细胞裂解液转移至 1.5 ml EP 管中，并将试管置于 4℃ 低速旋转 1h；
- (7) 当进行裂解时，制备链亲和素 Beads：取 40 μ l Beads，用 0.5 ml DPBS 清洗两次，再用 0.5 ml LB2 缓冲液清洗两次（每次 3000 g, 4℃ 离心 30s，去除上清），最后一次洗涤结束后，用 20 μ l LB3 缓冲液重悬 Beads；
- (8) 细胞裂解结束后 16000 g，4℃ 离心 15min；
- (9) 将上清转移到 1.5ml EP 管中，取 10%-15% 至新的管中作为 Input 样品，剩余为 Pull down 样品；
- (10) 将剩余的蛋白样品与（7）制备的 40 μ l Beads 在混匀仪上 4℃ 过夜孵育；
- (11) 孵育结束后 16000 g，4℃ 离心 30s，去除上清；
- (12) 加入 1ml LB3 缓冲液清洗一次，LB2 缓冲液清洗两次，SWS 缓冲液清洗两次，LB1 缓冲液清洗一次，16000 g，4℃ 离心 30s，去除上清；
- (13) 加入 25 μ l 2xloading buffer 重悬，70℃ 煮样 10min，将样品保存在 -20℃，用于 Western blot。

2.6.3.5 细胞外检测

- (1) 将培养 48h 后的细胞从培养箱取出，收集培养基到 1.5ml EP 离心管中，4000rpm 离心 10min，去除细胞沉淀，将上清转移到新的 1.5ml EP 管中，13000rpm 离心 10min，取上清 0.22 μ m 滤器过滤；
- (2) 将真空离心浓缩仪提前离心 15min 抽取空气，将样品配平放入机器，根据浓缩情况调整离心时间。

2.6.3.6 体外 T 细胞激活实验

- (1) 包被 CD3 抗体：在 1ml PBS 中加入 2.5 μ l CD3 抗体，轻弹混匀，加入 12 孔板

中，用保鲜膜将其包裹密闭，4℃静置 12h；

（2）将 12 孔板中的 PBS 吸出，在 1×10^6 Jurkat 细胞悬液中加入 2.5μl CD28 抗体和目的蛋白，吹吸混匀，缓慢加入 12 孔板中，放入细胞培养箱培养；

（3）培养 18h 后取出，将细胞转移到 1.5ml EP 管中，800rpm 离心 5min，取上清到新的 EP 管中，保存到 -20℃ 冰箱，后续可用于 Elisa 检测蛋白活性；

（4）取 100μl FACS 重悬细胞，取出 50μl 到新的 EP 管中作为阴性对照，剩余管中加 0.625μl CD25 抗体，2.5μl CD69 抗体和 2.5μl CD3 抗体作为阳性对照，吹吸混匀，4℃避光孵育 30min；

（5）1500rpm 离心 5min，去除上清，加 200μl FACS 重悬细胞，1500rpm 离心 5min，去除上清，如此重复两次；

（6）600μl FACS 重悬细胞，加入 5μl 7-AAD 轻弹混匀，避光染色 5min，将细胞悬液过 400 目筛网分离成单个细胞，上机流式细胞仪。

2.6.4 实验结果

2.6.4.1 NSP5 对 ORF7a 亚细胞定位的影响

本实验采用免疫荧光检测 ORF7a 的亚细胞定位。ORF7a 的 N 端带有 GFP 标签，C 端带有 Flag 标签。共聚焦结果表明，ORF7a 定位在细胞质，与 NSP5 共转后 ORF7a 有部分入核，在此基础上加入 GC376 后 ORF7a 重新定位在细胞质，说明 NSP5 改变 ORF7a 细胞质定位（图 2.13A）。N 蛋白已经被报道定位在细胞膜上^[100]

（图 2.13B），以此作为阳性对照，利用生物素-链亲和素结合的方法研究 ORF7a 的膜定位。Western blot 结果显示：只有 ORF7a 表达时，其定位在细胞膜上，与 NSP5 共转后，ORF7a 在膜上检测不到（图 2.13C），说明 NSP5 改变 ORF7a 细胞膜定位。已有文献报道可在细胞外检测到 ORF8^[101]，以此为阳性对照，检测细胞外 ORF7a 表达情况。转染 7.5μg ORF7a 到 293T 细胞，48h 后收集培养基，并按 4.6.3.5 方法收获样品。Western blot 结果显示：细胞外检测不到 ORF7a，与 NSP5 共转也无明显变化（图 2.13D），说明 ORF7a 不分泌到细胞外。

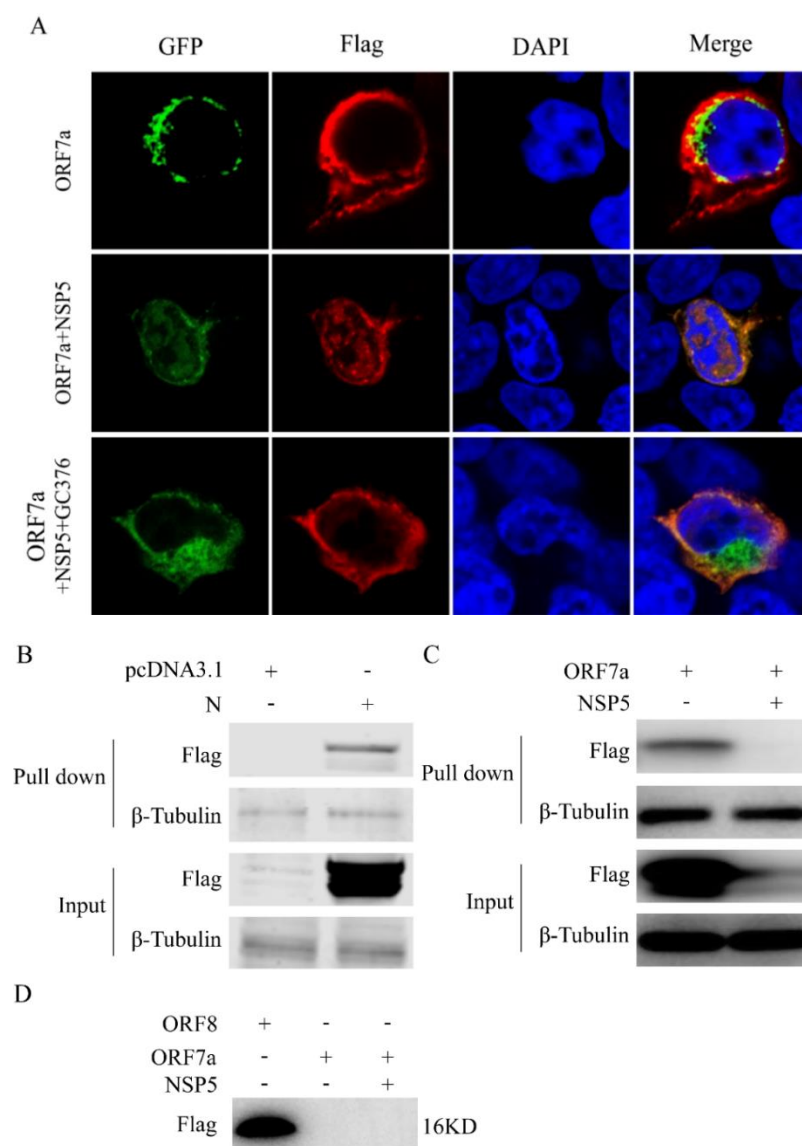


图 2.13 NSP5 对 ORF7a 亚细胞定位的影响

Fig. 2.13 The effect of NSP5 on subcellular localization of ORF7a

注：A：共聚焦观察 ORF7a 和 ORF7a 与 NSP5 共转染后在 HEK-293T 细胞的亚细胞定位；B：N 在细胞膜的定位；C：ORF7a 在细胞膜的定位；D：ORF7a 在细胞外的定位。

2.6.4.2 ORF7a 切割产物对 T 细胞激活的影响

为研究 NSP5 切割 ORF7a 的小分子切割产物对 T 细胞激活的影响，设置 3 组实验，第一组 ORF7a，第二组 NSP5，第三组 NSP5+ORF7a，ORF7a 设为 5.75 μ g，NSP5 设为 17.25 μ g，转染 293T 细胞后 48h 收集蛋白，用 3KD 超滤管超滤，将外管蛋白浓缩，用 PBS 透析内管和外管蛋白，取 5 μ g 蛋白和 CD28 一起孵育，CD3 和 CD28 作为阳性对照（图 2.14A），流式检测 Jurkat 细胞 CD25 和 CD69 激活情况。

CD25 和 CD69 双阳结果显示：ORF7a 内管蛋白（图 2.14B）和 NSP5 内管蛋白（图 2.14C）与阳性对照相比几乎没有变化，说明对 T 细胞激活几乎没有影响；NSP5+ORF7a 的内管蛋白（图 2.14D）比阳性对照高，说明 NSP5 切割 ORF7a 后对 T 细胞激活有刺激作用；ORF7a，NSP5，NSP5+ORF7a 的外管蛋白（图 2.14E,F,G）都比阳性对照高，说明 NSP5 切割 ORF7a 产生的小分子切割产物对 T 细胞激活有刺激作用。

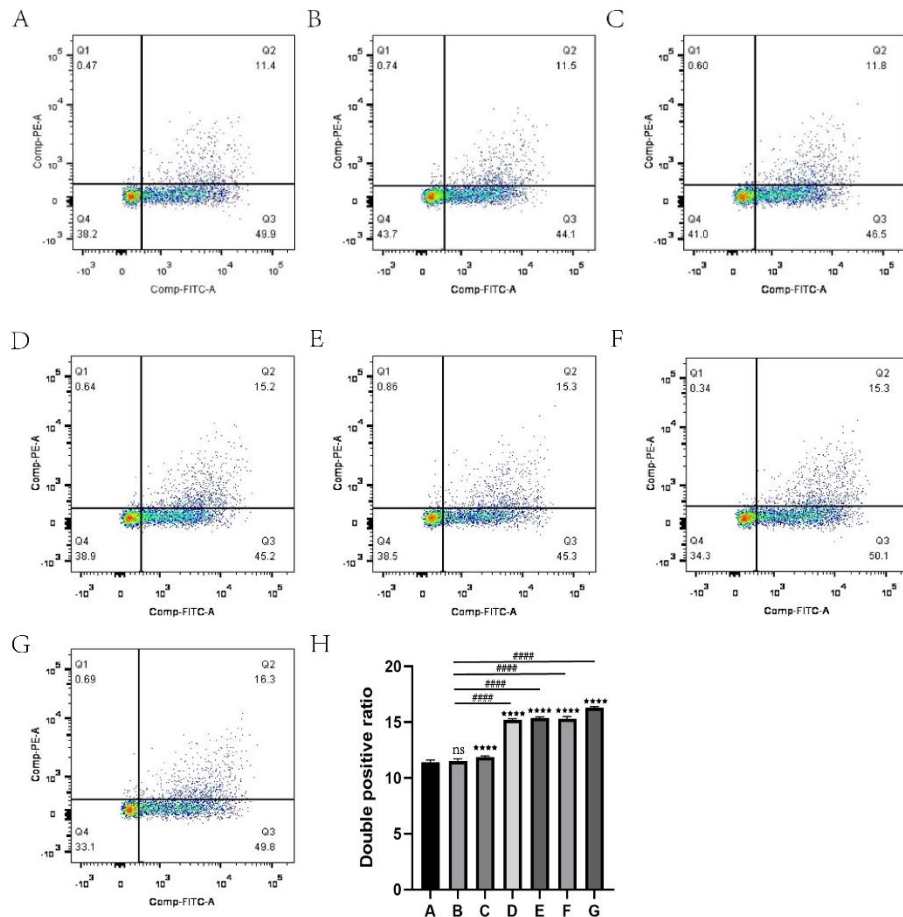


图 2.14 ORF7a 切割产物对 T 细胞激活的影响

Fig. 2.14 The effect of ORF7a cleavage products on T cell activation

注：A：CD3+CD28；B：CD3+CD28+ORF7a；C：CD3+CD28+NSP5；D：CD3+CD28+（NSP5+ORF7a）；E：CD3+CD28+ORF7a (≤ 3 KD)；F：CD3+CD28+NSP5 (≤ 3 KD)；G：CD3+CD28+（NSP5+ORF7a）(≤ 3 KD)；H：数据差异显著分析。

2.6.4.3 ORF7a 切割产物与宿主蛋白的互作鉴定

将 N 端带 Myc 标签 C 端带 Flag 标签的 ORF7a 与 NSP5 共转 293T 细胞，48h 后

收集蛋白，并用 Myc 和 Flag 磁珠分别富集蛋白，质谱分析 ORF7a 切割产物互作蛋白。经数据分析后得到 8 个候选基因。

a. 目的基因扩增

候选的 8 个基因，包括 *IGKV2D-29*、*PGAM5*、*ALB*、*H2BC12*、*RPS5*、*IDH1*、*NPM1* 和 *PHB2*。PCR 扩增它们的全基因序列，*IGKV2D-29* 目的片段大小为 420bp，*H2BC12* 目的片段大小为 438bp，*RPS5* 目的片段大小为 672bp，*PHB2* 目的片段大小为 957bp，*PGAM5* 目的片段大小为 927bp，*NPM1* 目的片段大小为 942bp，*ALB* 片段过长，分为两个片段克隆，片段 1 为 945bp，片段 2 为 957bp，*IDH1* 目的片段大小为 1302bp，其中 *IGKV2D-29*、*PGAM5* 和 *ALB* 片段 1 没有正确条带，其它片段大小与预期结果一致（图 2.15）。

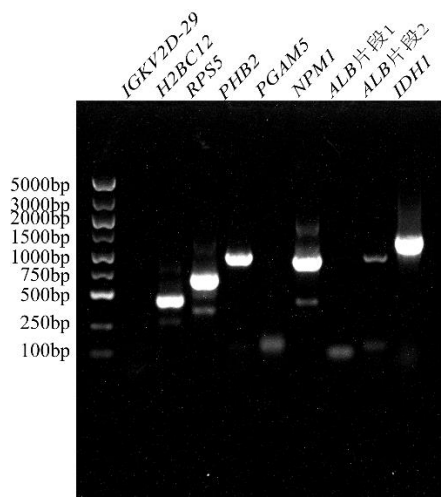


图 2.15 *IGKV2D-29*、*PGAM5*、*ALB*、*RPS5*、*IDH1*、*NPM1*、*PHB2* 目的片段扩增

Fig. 2.15 Amplification of *IGKV2D-29*、*PGAM5*、*ALB*、*RPS5*、*IDH1*、*NPM1*、*PHB2* fragments

b. 测序正确

每个基因挑取 8 个单克隆，菌液 PCR 筛选条带正确的克隆，测序，*H2BC12*、*RPS5*、*IDH1*、*NPM1* 和 *PHB2* 测序正确。

c. 免疫共沉淀鉴定

设置 6 组，第一组 pcDNA3.1 阴性对照，第二组 ORF7a，第三组 NSP5+ORF7a，第四组 互作蛋白，第五组 ORF7a+互作蛋白，第六组 NSP5+ORF7a+互作蛋白。ORF7a N 端带 Myc 标签 C 端带 Flag 标签，互作蛋白和 NSP5 C 端带 HA 标签，转染 293T 细胞，48h 后利用 Myc 和 Flag 磁珠进行免疫共沉淀。Western blot 结果显示：*IDH1* 的 Input 组能检测到，但 Co-IP 没有检测到；*H2BC12* 在 Input 和 Co-IP 中都能检测到，但在没有 ORF7a 的情况下，Co-IP 也能检测到，说明 *H2BC12* 是 ORF7a 的

非特异结合；RPS5 在 Input 和 Co-IP 中都能检测到，但在没有 ORF7a 的情况下，Co-IP 也能检测到，说明 RPS5 也是 ORF7a 的非特异结合。

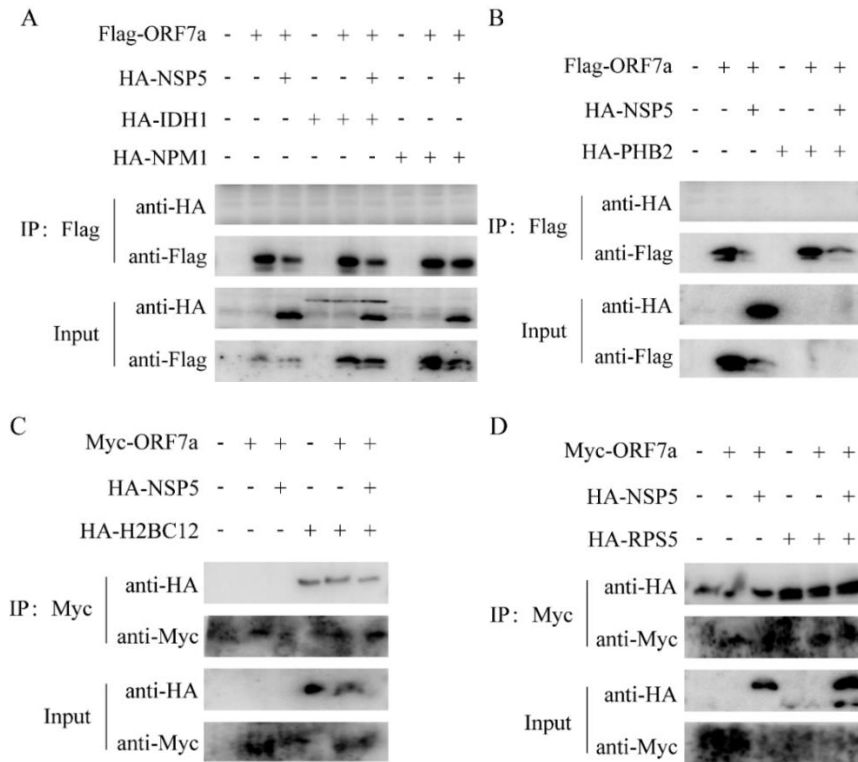


图 2.16 ORF7a 切割产物互作蛋白免疫共沉淀鉴定

Fig. 2.16 Co-IP identification of ORF7a cleavage product interacting proteins

注：A：ORF7a 切割产物与 IDH1 和 NPM1 的互作鉴定，IDH1 分子量 47.7KD，NPM1 分子量 33.66KD；B：ORF7a 切割产物与 PHB2 的互作鉴定，PHB2 分子量 34.39KD；C：ORF7a 切割产物与 H2BC12 的互作鉴定，H2BC12 分子量 15KD；D：ORF7a 切割产物与 RPS5 的互作鉴定，RPS5 分子量 23.96KD。

2.6.5 讨论与小结

已有研究报道新冠病毒蛋白 ORF7a 定位在细胞质并且在高尔基体上，本研究发现 ORF7a 定位在细胞质，与 NSP5 共转后，ORF7a 部分入核，改变了 ORF7a 细胞质定位。用生物素标记膜蛋白，利用生物素-链亲和素结合的技术，Western blot 结果观察到 ORF7a 定位在细胞膜，与 NSP5 共转后，ORF7a 膜定位消失，说明 NSP5 切割改变 ORF7a 的亚细胞定位。体外 T 细胞激活实验表明，NSP5 切割后的小分子切割产物可在体外刺激 T 细胞激活。利用 IP-MS 筛选 ORF7a 切割产物与宿主的互作蛋白，利用 Co-IP 鉴定互作，发现在没有 ORF7a 的情况下仍能检测到候选互作蛋白，说明该候选互作蛋白与 ORF7a 是非特异结合，需进一步探索。

3 总结与展望

本课题首次发现新冠病毒 NSP5 切割自身附属蛋白 ORF7a 并具有复杂识别位点, NSP5 切割改变 ORF7a 的亚细胞定位, 切割产物对 T 细胞激活有刺激作用。

NSP5 是新冠病毒主要蛋白酶, 可将多聚蛋白 pp1a 和 pp1ab 切割成多个非结构蛋白 NSP4-NSP16, 有报道了 NSP5 切割宿主内源蛋白, 但未见报道 NSP5 切割新冠病毒自身的附属蛋白。NSP5 识别的 P1 位置是谷氨酰胺, P2 位置是亮氨酸, 苯丙氨酸, 缬氨酸, 而 ORF7a 第 93 和 94 位是缬氨酸和谷氨酰胺, 该位点可能是 NSP5 的潜在识别位点。在 NSP5 和 ORF7a 双质粒转染实验中, 通过 Western Blot 观察到 NSP5 切割 ORF7a, 并且随着 NSP5 的量增加, ORF7a 的表达量减少。在 6h, 12h, 24h 时间点均能检测到 NSP5 切割 ORF7a。NSP5 与含有切割识别序列 NSP4-5 的阳性对照共转后, 随着 NSP5 的量增加, 阳性对照主带逐渐减少, 并出现切割条带, 说明 NSP5 能正常发挥识别和切割的功能。

为进一步确定 NSP5 切割 ORF7a, 将其第 145 位半胱氨酸突变为丙氨酸, 构建突变体 NSP5-C145A, 与 ORF7a 按一定比例共转染, Western Blot 结果显示随着 NSP5-C145A 的量的增加, ORF7a 的量并没有减少, 这说明 NSP5 识别并切割 ORF7a。

此外, 我们采用荧光能量共振转移实验 (FRET) 检测 NSP5 对 ORF7a 的酶切活性, 随着 S2NSP5 剂量的增加, FRET 现象逐渐减弱, 说明 NSP5 切割 ORF7a 量逐渐增多, 这与上述 Western Blot 结果一致。以上三个实验证实, 新冠病毒 NSP5 对自身 ORF7a 具有切割作用。

进一步研究 NSP5 切割 ORF7a 产生的切割产物, 首先探究了 GC376 对 NSP5 切割阳性对照这一过程产生抑制作用, 分别在 ORF7a 的 N 端和 C 端带上 GFP 标签后, GC376 处理组的 ORF7a 主带有所回升, 但切割条带逐渐减少, 提示我们 ORF7a 含有复杂的切割位点, 且宿主中可能含有 NSP5 的同功酶。为排除宿主蛋白降解的作用, 从蛋白酶体, 溶酶体和 caspase 三个途径检验对 NSP5 切割 ORF7a 的影响。使用对应抑制剂处理后, 发现 NSP5 能正常切割 ORF7a, 说明这三个降解蛋白的途径对这一过程无明显影响。进一步研究 NSP5 对 ORF7a 的具体切割位点, 构建了 ORF7a 潜在切割位点系列突变体, 与 NSP5 双质粒共转染实验的结果显示, Q21,

Q76 位点的突变对 NSP5 的切割有影响，但未能阻止 NSP5 对 ORF7a 的切割。参考最新证实的谷氨酸（E）位点也是 NSP5 识别位点的报道，我们进一步构建了 ORF7a 的 Q 与 E 的突变体，但未能完全阻止 NSP5 对 ORF7a 的切割，提示 NSP5 对 ORF7a 具有复杂切割位点，需进一步研究挖掘所有 NSP5 识别切割序列。

为进行无细胞酶切，成功纯化 NSP5 蛋白，ORF7a 包涵体复性需进一步摸索洗杂和洗脱条件。将 NSP5 切割 ORF7a 后的蛋白超滤，浓缩，观察到小分子切割产物，但不能确定其分子量和氨基酸序列，需进一步验证。

已有研究报道新冠病毒蛋白 ORF7a 定位在细胞质，特别是在高尔基体上，本研究发现 ORF7a 定位在细胞质，与 NSP5 共转后，ORF7a 部分入核，改变了 ORF7a 细胞质定位。用生物素标记膜蛋白，利用生物素-链亲和素结合的技术，Western blot 结果观察到 ORF7a 定位在细胞膜，与 NSP5 共转后，ORF7a 膜定位消失，说明 NSP5 切割改变 ORF7a 的亚细胞定位。体外 T 细胞激活实验表明，NSP5 切割后的小分子切割产物可在体外刺激 T 细胞激活。利用 IP-MS 筛选 ORF7a 切割产物与宿主的互作蛋白，利用 Co-IP 鉴定互作，发现在没有 ORF7a 的情况下仍能检测到候选互作蛋白，说明该候选互作蛋白与 ORF7a 是非特异结合，需进一步探索 ORF7a 切割产物与宿主的互作蛋白。综上所述，本课题后续将进一步完善包涵体复性条件，得到 ORF7a 纯化蛋白，与 NSP5 进行体外无细胞酶切实验，确定 NSP5 识别 ORF7a 的位点，进行 ORF7a 截短表达，深入研究其与 NSP5 的关系以及对宿主的影响。

参考文献

- [1] Bai C, Zhong Q, Gao GF. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins[J]. *Sci China Life Sci*, 2022, 65(2): 280-294.
- [2] Kirtipal N, Bharadwaj S, Kang SG. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses[J]. *Infect Genet Evol*, 2020, 85:104502.
- [3] Jiang C, Li X, Ge C, *et al.* Molecular detection of SARS-CoV-2 being challenged by virus variation and asymptomatic infection[J]. *Pharm Anal*, 2021, 11(3):257-264.
- [4] 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.
- [5] Tam D, Lorenzo-Leal AC, Hernández LR, *et al.* Targeting SARS-CoV-2 non-structural proteins[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(16):13002.
- [6] Arya R, Kumari S, Pandey B, *et al.* Structural insights into SARS-CoV-2 proteins[J]. *Mol Biol*, 2021, 433(2):166725.
- [7] He R, Leeson A, Ballantine M, *et al.* Characterization of protein-protein interactions between the nucleocapsid protein and membrane protein of the SARS coronavirus[J]. *Virus Res*, 2004, 105(2):121-5.
- [8] Zandi M, Shafaati M, Kalantar-Neyestanaki D, *et al.* The role of SARS-CoV-2 accessory proteins in immune evasion[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 156:113889.
- [9] V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, *et al.* Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(3):155-170.
- [10] 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.
- [11] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A multibasic cleavage site in the Spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells[J]. *Mol Cell*, 2020, 78(4):779-784.e5.
- [12] Shang J, Wan Y, Luo C, *et al.* Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(21):11727-11734.

- [13] Glowacka I, Bertram S, Müller MA, *et al.* Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response[J]. *Viol*, 2011, 85(9):4122-34.
- [14] Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, *et al.* Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2[J]. *Viol*, 2010, 84(24):12658-64.
- [15] Shulla A, Heald-Sargent T, Subramanya G, *et al.* A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry[J]. *Viol*, 2011, 85(2):873-82.
- [16] Huang IC, Bosch BJ, Li F, *et al.* SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells[J]. *Biol Chem*, 2006, 281(6):3198-203.
- [17] Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, *et al.* Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(33):11876-81.
- [18] Chang CK, Hsu YL, Chang YH, *et al.* Multiple nucleic acid binding sites and intrinsic disorder of severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein: implications for ribonucleocapsid protein packaging[J]. *Viol*, 2009, 83(5):2255-64.
- [19] Dinesh DC, Chalupska D, Silhan J, *et al.* Structural basis of RNA recognition by the SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein[J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(12):e1009100.
- [20] Chen CY, Chang CK, Chang YW, *et al.* Structure of the SARS coronavirus nucleocapsid protein RNA-binding dimerization domain suggests a mechanism for helical packaging of viral RNA[J]. *Mol Biol*, 2007, 368(4):1075-86.
- [21] Takeda M, Chang CK, Ikeya T, *et al.* Solution structure of the c-terminal dimerization domain of SARS coronavirus nucleocapsid protein solved by the SAIL-NMR method[J]. *Mol Biol*, 2008, 380(4):608-22.
- [22] Peng TY, Lee KR, Tarn WY. Phosphorylation of the arginine/serine dipeptide-rich motif of the severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein modulates its multimerization, translation inhibitory activity and cellular

- localization[J]. FEBS J, 2008, 275(16):4152-63.
- [23] Hilser VJ, Thompson EB. Intrinsic disorder as a mechanism to optimize allosteric coupling in proteins[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(20):8311-5.
- [24] 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.
- [25] Chen K, Xiao F, Hu D, *et al.* SARS-CoV-2 nucleocapsid protein interacts with RIG-I and represses RIG-mediated IFN- β production[J]. Viruses, 2020, 13(1):47.
- [26] Mu J, Fang Y, Yang Q, *et al.* SARS-CoV-2 N protein antagonizes type I interferon signaling by suppressing phosphorylation and nuclear translocation of STAT1 and STAT2[J]. Cell Discov, 2020, 6:65.
- [27] Bianchi M, Benvenuto D, Giovanetti M, *et al.* Sars-CoV-2 envelope and membrane proteins: structural differences linked to virus characteristics[J]? Biomed Res Int, 2020, 2020:4389089.
- [28] Neuman BW, Kiss G, Kunding AH, *et al.* A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology[J]. Struct Biol, 2011, 174(1):11-22.
- [29] Cagliani R, Forni D, Clerici M, *et al.* Computational inference of selection underlying the evolution of the novel coronavirus, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2[J]. Virol, 2020, 94(12):e00411-20.
- [30] Ujike M, Taguchi F. Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions[J]. Viruses, 2015, 7(4):1700-25.
- [31] De Haan CA, Vennema H, Rottier PJ. Assembly of the coronavirus envelope: homotypic interactions between the M proteins[J]. Virol, 2000, 74(11):4967-78.
- [32] Tseng YT, Chang CH, Wang SM, *et al.* Identifying SARS-CoV membrane protein amino acid residues linked to virus-like particle assembly[J]. PLoS One, 2013, 8(5):e64013.
- [33] Kumar P, Kumar A, Garg N, *et al.* An insight into SARS-CoV-2 membrane protein interaction with spike, envelope, and nucleocapsid proteins[J]. Biomol Struct Dyn, 2023, 41(3):1062-1071.
- [34] Wong NA, Saier MH Jr. The SARS-Coronavirus infection cycle: A survey of viral Membrane proteins, their functional interactions and pathogenesis[J]. Int J Mol Sci,

2021, 22(3):1308.

- [35] Rndt AL, Larson BJ, Hogue BG. A conserved domain in the coronavirus membrane protein tail is important for virus assembly[J]. *Virol*, 2010, 84(21):11418-28.
- [36] Klumperman J, Locker JK, Meijer A, *et al.* Coronavirus M proteins accumulate in the golgi complex beyond the site of virion budding[J]. *Virol*, 1994, 68(10):6523-34.
- [37] El Omari K, Li S, Kotecha A, *et al.* The structure of a prokaryotic viral envelope protein expands the landscape of membrane fusion proteins[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):846.
- [38] Alsaadi EAJ, Neuman BW, Jones IM. Identification of a Membrane binding peptide in the Envelope protein of MHV coronavirus[J]. *Viruses*, 2020, 12(9):1054.
- [39] Boson B, Legros V, Zhou B, *et al.* The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles[J]. *Biol Chem*, 2021, 296:100111.
- [40] Venkatagopalan P, Daskalova SM, Lopez LA, *et al.* Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly[J]. *Virology*, 2015, 478:75-85.
- [41] Mukherjee S, Bhattacharyya D, Bhunia A. Host-membrane interacting interface of the SARS coronavirus envelope protein: Immense functional potential of C-terminal domain[J]. *Biophys Chem*, 2020, 266:106452.
- [42] Nieto-Torres JL, Dediego ML, Alvarez E, *et al.* Subcellular location and topology of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein[J]. *Virology*, 2011, 415(2):69-82.
- [43] Curtis KM, Yount B, Baric RS. Heterologous gene expression from transmissible gastroenteritis virus replicon particles[J]. *Virol*, 2002, 76(3):1422-34.
- [44] Minkoff JM, tenOever B. Innate immune evasion strategies of SARS-CoV-2[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2023, 21(3):178-194.
- [45] Kumar A, Ishida R, Strilets T, *et al.* SARS-CoV-2 nonstructural protein 1 inhibits the interferon response by causing depletion of key host signaling factors[J]. *Virol*, 2021, 95(13):e0026621.
- [46] Banerjee AK, Blanco MR, Bruce EA, *et al.* SARS-CoV-2 disrupts splicing, translation, and protein trafficking to suppress host defenses[J]. *Cell*, 2020,

- 183(5):1325-1339.e21.
- [47] Thoms M, Buschauer R, Ameisemeier M, *et al.* Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2[J]. *Science*, 2020, 369(6508):1249-1255.
- [48] Xu Z, Choi JH, Dai DL, *et al.* SARS-CoV-2 impairs interferon production via NSP2-induced repression of mRNA translation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(32):e2204539119.
- [49] Naeli P, Zhang X, Snell PH, *et al.* The SARS-CoV-2 protein NSP2 enhances microRNA-mediated translational repression[J]. *Cell Sci*, 2023, 136(19):jcs261286.
- [50] Shin D, Mukherjee R, Grewe D, *et al.* Papain-like protease regulates SARS-CoV-2 viral spread and innate immunity[J]. *Nature*, 2020, 587(7835):657-662.
- [51] Faizan MI, Chaudhuri R, Sagar S, *et al.* NSP4 and ORF9b of SARS-CoV-2 induce pro-inflammatory mitochondrial DNA release in inner membrane-derived vesicles[J]. *Cells*, 2022, 11(19):2969.
- [52] Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, *et al.* The molecular virology of coronaviruses[J]. *Biol Chem*, 2020, 295(37):12910-12934.
- [53] Cortese M, Lee JY, Cerikan B, *et al.* Integrative imaging reveals SARS-CoV-2-induced reshaping of subcellular morphologies[J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 28(6):853-866.e5.
- [54] Ricciardi S, Guarino AM, Giaquinto L, *et al.* The role of NSP6 in the biogenesis of the SARS-CoV-2 replication organelle[J]. *Nature*, 2022, 606(7915):761-768.
- [55] 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]. *Med Virol*, 2023, 95(3):e28561.
- [56] Ong S, Wu Y, Li W, *et al.* SARS-CoV-2 Nsp8 induces mitophagy by damaging mitochondria[J]. *Virol Sin*, 2023, 38(4):520-530.
- [57] Deng J, Zheng SN, Xiao Y, *et al.* SARS-CoV-2 NSP8 suppresses type I and III IFN responses by modulating the RIG-I/MDA5, TRIF, and STING signaling pathways[J]. *Med Virol*, 2023, 95(4):e28680.
- [58] Schmidt N, Ganskih S, Wei Y, *et al.* SND1 binds SARS-CoV-2 negative-sense RNA and promotes viral RNA synthesis through NSP9[J]. *Cell*, 2023, 186(22):4834-

4850.e23.

- [59] Bouvet M, Lugari A, Posthuma CC, *et al.* Coronavirus Nsp10, a critical co-factor for activation of multiple replicative enzymes[J]. Biol Chem, 2014, 289(37):25783-96.
- [60] Ma Y, Wu L, Shaw N, *et al.* Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14-nsp10 complex[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(30):9436-41.
- [61] Deming DJ, Graham RL, Denison MR, *et al.* Processing of open reading frame 1a replicase proteins nsp7 to nsp10 in murine hepatitis virus strain A59 replication[J]. Virol, 2007, 81(19):10280-91.
- [62] Fang SG, Shen H, Wang J, *et al.* Proteolytic processing of polyproteins 1a and 1ab between non-structural proteins 10 and 11/12 of coronavirus infectious bronchitis virus is dispensable for viral replication in cultured cells[J]. Virology, 2008, 379(2):175-80.
- [63] Gadhav K, Kumar P, Kumar A, *et al.* Conformational dynamics of 13 amino acids long NSP11 of SARS-CoV-2 under membrane mimetics and different solvent conditions[J]. Microb Pathog, 2021, 158:105041.
- [64] Wang W, Zhou Z, Xiao X, *et al.* SARS-CoV-2 nsp12 attenuates type I interferon production by inhibiting IRF3 nuclear translocation[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(4):945-953.
- [65] Fung SY, Siu KL, Lin H, *et al.* SARS-CoV-2 NSP13 helicase suppresses interferon signaling by perturbing JAK1 phosphorylation of STAT1[J]. Cell Biosci, 2022, 12(1):36.
- [66] Li TW, Kenney AD, Park JG, *et al.* SARS-CoV-2 Nsp14 protein associates with IMPDH2 and activates NF- κ B signaling[J]. Front Immunol, 2022, 13:1007089.
- [67] Otter CJ, Bracci N, Parenti NA, *et al.* SARS-CoV-2 nsp15 endoribonuclease antagonizes dsRNA-induced antiviral signaling[J]. BioRxiv, 2023, 2023.11.15.566945.
- [68] Vithani N, Ward MD, Zimmerman MI, *et al.* SARS-CoV-2 Nsp16 activation mechanism and a cryptic pocket with pan-coronavirus antiviral potential[J]. Biophys J, 2021, 120(14):2880-2889.
- [69] Su J, Shen S, Hu Y, *et al.* SARS-CoV-2 ORF3a inhibits cGAS-STING-mediated

- autophagy flux and antiviral function[J]. *Med Virol*, 2023, 95(1):e28175.
- [70] Konno Y, Kimura I, Uriu K, *et al.* SARS-CoV-2 ORF3b is a potent interferon antagonist whose activity is increased by a naturally occurring elongation variant[J]. *Cell Rep*, 2020, 32(12):108185.
- [71] Redondo N, Zaldívar-López S, Garrido JJ, *et al.* SARS-CoV-2 accessory proteins in viral pathogenesis: knowns and unknowns[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:708264.
- [72] Addetia A, Lieberman NAP, Phung Q, *et al.* SARS-CoV-2 ORF6 disrupts bidirectional nucleocytoplasmic transport through interactions with rae1 and nup98[J]. *mBio*, 2021, 12(2):e00065-21.
- [73] Yang R, Zhao Q, Rao J, *et al.* SARS-CoV-2 accessory protein ORF7b mediates tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in cells[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12:654709.
- [74] Zhang Y, Chen Y, Li Y, *et al.* The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-I[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(23):e2024202118.
- [75] Wu J, Shi Y, Pan X, *et al.* SARS-CoV-2 ORF9b inhibits RIG-I-MAVS antiviral signaling by interrupting K63-linked ubiquitination of NEMO[J]. *Cell Rep*, 2021, 34(7):108761.
- [76] Dominguez Andres A, Feng Y, Campos AR, *et al.* SARS-CoV-2 ORF9c is a membrane-associated protein that suppresses antiviral responses in cells[J]. *BioRxiv*, 2020, 2020.08.18.256776.
- [77] Han L, Zheng Y, Deng J, *et al.* SARS-CoV-2 ORF10 antagonizes STING-dependent interferon activation and autophagy[J]. *Med Virol*, 2022, 94(11):5174-5188.
- [78] 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.
- [79] Li W, Qiao J, You Q, *et al.* SARS-CoV-2 Nsp5 activates NF- κ B pathway by upregulating sumoylation of MAVS[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:750969.
- [80] Zheng Y, Deng J, Han L, *et al.* SARS-CoV-2 NSP5 and N protein counteract the RIG-I signaling pathway by suppressing the formation of stress granules[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1):22.
- [81] 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 USA*, 2016, 113(46):12997-13002.
- [82] Yang H, Yang M, Ding Y, *et al.* The crystal structures of severe acute respiratory syndrome virus main protease and its complex with an inhibitor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(23):13190-5.
- [83] Hsu MF, Kuo CJ, Chang KT, *et al.* Mechanism of the maturation process of SARS-CoV 3CL protease[J]. *Biol Chem*, 2005, 280(35):31257-66.
- [84] Wang D, Fang L, Shi Y, *et al.* Porcine epidemic diarrheavirus 3C-like protease regulates its interferon antagonism by cleaving NEMO[J]. *Virology*, 2015, 90(4):2090-101.
- [85] 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]. *Virology*, 2022, 96(8): e0003722.
- [86] 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.
- [87] Dewe JM, Fuller BL, Lentini JM, *et al.* TRMT1-Catalyzed tRNA modifications are required for redox homeostasis to ensure proper cellular proliferation and oxidative stress survival[J]. *Mol Cell Biol*, 2017, 37(21): e00214-17.
- [88] Lu JL, Zhou XL. SARS-CoV-2 main protease Nsp5 cleaves and inactivates human tRNA methyltransferase TRMT1[J]. *Mol Cell Biol*, 2023, 15(4): mjad024.
- [89] Hou P, Wang X, Wang H, *et al.* The ORF7a protein of SARS-CoV-2 initiates autophagy and limits autophagosome-lysosome fusion via degradation of SNAP29 to promote virus replication[J]. *Autophagy*, 2023, 19(2):551-569.
- [90] Nishitsuji H, Iwahori S, Ohmori M, *et al.* Ubiquitination of SARS-CoV-2 NSP6 and ORF7a facilitates NF- κ B activation[J]. *mBio*, 2022, 13(4): e0097122.
- [91] Sood C, Marin M, Chande A, *et al.* SERINC5 protein inhibits HIV-1 fusion pore formation by promoting functional inactivation of envelope glycoproteins[J]. *Biol Chem*, 2017, 292(14):6014-6026.
- [92] Timilsina U, Umthong S, Ivey EB, *et al.* SARS-CoV-2 ORF7a potentially inhibits the antiviral effect of the host factor SERINC5[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):2935.
- [93] Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of antigen processing[J]. *Annu Rev*

- Immunol, 2013, 31:443-73.
- [94] Arshad N, Laurent-Rolle M, Ahmed WS, *et al.* SARS-CoV-2 accessory proteins ORF7a and ORF3a use distinct mechanisms to downregulate MHC-I surface expression[J]. BioRxiv, 2022, 2022.05.17.492198.
- [95] Förster T. Energy migration and fluorescence[J]. Biomed Opt, 2012, 17(1):011002.
- [96] Bajar BT, Guan X, Lam A, *et al.* FRET imaging of rho GTPase activity with red fluorescent protein-based FRET pairs[J]. Methods Mol Biol, 2022, 2438:31-43.
- [97] 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.
- [98] Wang YC, Yang WH, Yang CS, *et al.* Structural basis of SARS-CoV-2 main protease inhibition by a broad-spectrum anti-coronaviral drug[J]. Am J Cancer Res, 2020, 10(8):2535-2545.
- [99] Zhang S, Wang J, Cheng G. Protease cleavage of RNF20 facilitates coronavirus replication via stabilization of SREBP1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 118(37): e2107108118.
- [100] Schaefer SL, Jung H, Hummer G. Binding of SARS-CoV-2 fusion peptide to host endosome and plasma membrane[J]. Phys Chem B, 2021, 125(28):7732-7741.
- [101] Matsuoka K, Imahashi N, Ohno M, *et al.* SARS-CoV-2 accessory protein ORF8 is secreted extracellularly as a glycoprotein homodimer[J]. Biol Chem, 2022, 298(3):101724.