

分 类 号: R915
研究生学号: 2021774017

单位代码 10183
密 级: 公开



吉 林 大 学

硕士学位论文

(专业学位)

靶向新型冠状病毒 S 蛋白去糖基化编辑器的构建与功能验证

Building and functional validation of a targeted deglycosylation editing
tool for the SARS - CoV - 2 S Protein.

作 者 姓 名: 张子怡
类 别: 药 学
研 究 方 向: 生物医学工程
指 导 教 师: 霍锐 副教授; 田朝光 研究员
培 养 单 位: 药学院

2024 年 6 月

靶向新型冠状病毒 S 蛋白去糖基化编辑器的构建与功能验证

Building and functional validation of a targeted
deglycosylation editing tool for the SARS - CoV - 2 S
Protein.

作 者 姓 名：张子怡

研 究 方 向：生物医学工程

指 导 教 师：霍锐 副教授；
田朝光 研究员

类 别：药学

答 辩 日 期：2024 年 6 月 1 日

中文摘要

靶向新型冠状病毒 S 蛋白去糖基化编辑器的构建与功能验证

新型冠状病毒（SARS - CoV - 2）是导致新型冠状病毒肺炎（COVID - 19）的病原体，新型冠状病毒感染宿主细胞主要由病毒表面的刺突蛋白（Spike，S 蛋白）介导，由于其外观上类似王冠也被称为冠状蛋白。S 蛋白是高度糖基化的病毒膜蛋白，新冠病毒通过 S 蛋白识别并结合宿主细胞表面的 ACE2 受体（血管紧张素转化酶 2）将病毒的遗传物质注入到宿主细胞内，此外新冠病毒还依靠 S 蛋白表面的糖基化修饰躲避机体免疫系统的追击，造成“免疫逃逸”。

肽 N - 糖苷酶（PNGase）也被称作肽 - N - 天冬酰胺酶，是可以从糖蛋白中完整切割 N - 糖链的一类酰胺酶，主要参与蛋白质的内质网降解过程，可以识别错误折叠蛋白质并对其进行去糖基化修饰，随后介导蛋白质的降解。酿酒酵母来源的肽 N - 糖苷酶（PNG1）是由 363 个氨基酸组成的去糖基化酶，PNG1 结构中存在一个 Rad23p 结合结构域，由 4 个 α - 螺旋（H1、H2、H3、H4）组成，已有研究表明分别删除这 4 个 α - 螺旋后所表达的蛋白中，只有 PNG1 Δ H1 提高了其对变性糖蛋白的酶活性，并且出乎意料地，对天然正确折叠的糖蛋白也表现出高度的去糖基化活性。

论文的主要研究内容及结果如下：

（1）在 PNG1 的 N - 末端分别连接两个已经经过验证的对 S 蛋白受体结合结构域（Receptor - binding Domain，RBD）具有高亲和力的靶向肽“LCB1”和“23mer - A2N”，中间通过刚性连接子和柔性连接子进行连接。通过前期筛选，获得 3 个具有去糖基化活性的靶向编辑器，命名为：LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1；LCB1 - (EAAAK)₂ - ScPNG1 Δ H1；23mer - A2N - ScPNG1 Δ H1。

（2）对构建好的编辑器进行去糖基化编辑效果验证发现。在表达 S1 蛋白和表达全长 S 蛋白的两种细胞系中，靶向编辑器都表现出了明显的去糖基化效

果，尤其是融合了 LCB1 靶向肽和柔性连接子的靶向嵌合体 LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1 去糖基化效果最显著，说明 LCB1 靶向效果优于 23mer - A2N，并且五个氨基酸残基的 GGGGS 柔性连接子起到了很好的连接作用，使得靶向编辑器即使对于结构更加复杂的全长 S 蛋白仍具有较为明显的去糖基化效果。在膜融合以及病毒侵染实验中，LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1 使病毒的膜融合能力降低 50%左右并且使假病毒的侵染能力降低 70%左右，在蛋白质的稳定性分析中，转入靶向编辑器 LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1 后 S 蛋白的半衰期明显缩短，说明去糖基化编辑造成 S 蛋白不稳定，加速了其降解过程，并且验证了去糖基化形式的 S 蛋白主要通过蛋白酶体途径降解。

综上所述，本文成功构建了靶向新型冠状病毒 S 蛋白的去糖基化编辑器，并且对新型冠状病毒的膜融合和侵染都表现出了显著的抑制效果。

关键词：

新型冠状病毒，S 蛋白，N-糖苷酶，靶向去糖基化编辑，膜融合，病毒侵染

Abstract

Building and functional validation of a targeted deglycosylation editing tool for the SARS - CoV - 2 S Protein.

The novel coronavirus (SARS-CoV-2) is the pathogen that causes coronavirus disease 2019 (COVID-19). The infection of host cells by the novel coronavirus is mainly mediated by the spike protein (S protein) on the virus surface. Due to its crown-like appearance, it is also known as the coronal protein. The S protein is a highly glycosylated viral membrane protein. The novel coronavirus recognizes and binds to the ACE2 receptor (angiotensin-converting enzyme 2) on the surface of host cells through the S protein, injecting the virus's genetic material into the host cell. Additionally, the novel coronavirus evades the host immune system by relying on glycosylation modifications on the surface of the S protein, causing "immune escape."

Peptide N-glycosidase (PNGase), also known as peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl) asparagine amidase, is an amidase that can completely cleave N-glycan chains from glycoproteins. It mainly participates in the degradation process of proteins in the endoplasmic reticulum, recognizing misfolded proteins and performing deglycosylation modifications on them, subsequently mediating protein degradation. Peptide N-glycosidase derived from *Saccharomyces cerevisiae* (PNG1) is a

deglycosylating enzyme composed of 363 amino acids. The PNG1 structure contains a Rad23p binding domain, consisting of 4 alpha-helices (H1, H2, H3, H4). Previous studies have shown that deletion of these 4 alpha-helices individually in the expressed protein, only PNG1 Δ H1 increased its enzymatic activity towards denatured glycoproteins. Surprisingly, it also exhibited high deglycosylation activity towards naturally folded glycoproteins.

The main research content and results of the paper are as follows:

(1) At the N-terminus of PNG1, two validated high-affinity targeting peptides, "LCB1" and "23mer-A2N," targeting the receptor-binding domain (RBD) of the S protein, are connected through rigid and flexible linkers. Through preliminary screening, three targeting editors with deglycosylation activity were obtained, named: LCB1-GGGGS-ScPNG1 Δ H1; LCB1-(EAAAK)₂-ScPNG1 Δ H1; 23mer-A2N-ScPNG1 Δ H1.

(2) Verification of deglycosylation editing effects on the constructed editor revealed that in two cell lines expressing S1 protein and full-length S protein, the targeted editor exhibited significant deglycosylation effects. Particularly, the targeted chimeric protein LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1, which fused the LCB1 targeting peptide and a flexible linker, showed the most significant deglycosylation effect, indicating that the LCB1 targeting effect is superior to 23mer - A2N. The flexible linker of five amino acid residues GGGGS played a good connecting role, enabling the

targeted editor to exhibit a noticeable deglycosylation effect even on the more complex full-length S protein structure. In membrane fusion and virus infection experiments, LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 reduced the virus's membrane fusion ability by around 50% and decreased the infectivity of pseudovirus by approximately 70%. In protein stability analysis, the introduction of the targeted editor LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 significantly shortened the half-life of the S protein, indicating that deglycosylation editing caused the S protein to be unstable, accelerating its degradation process, and confirming that the deglycosylated form of the S protein is mainly degraded through the proteasome pathway. In conclusion, this study successfully constructed a deglycosylation editor targeting the novel coronavirus S protein, which exhibited significant inhibitory effects on the membrane fusion and infection of the novel coronavirus.

Key words:

Novel coronavirus, deglycosylation, targeting editor, virus infection, membrane fusion

目 录

第 1 章 绪论.....	1
1.1 新型冠状病毒.....	1
1.1.1 新型冠状病毒的简介.....	1
1.1.2 新型冠状病毒结构.....	2
1.1.3 新型冠状病毒侵染宿主细胞机制.....	5
1.1.4 新型冠状病毒流行病学特征.....	7
1.1.5 治疗新型冠状病毒感染的方法.....	8
1.2 蛋白质 N - 糖基化	9
1.2.1 蛋白质 N - 糖基化功能简介	9
1.2.2 新型冠状病毒的 N - 糖基化	10
1.3 酵母来源肽 N - 糖苷酶(PNG1).....	10
1.3.1 PNGase 的简介.....	10
1.3.2 PNG1 的结构与催化机制.....	12
1.3.3 PNG1 的改造.....	13
1.4 本文立题依据与主要研究内容	14
1.4.1 立题依据	14
1.4.2 主要研究内容.....	16
第 2 章 新型冠状病毒 S 蛋白靶向去糖基化编辑器的构建.....	17
2.1 引言.....	17
2.2 实验材料及仪器.....	18
2.2.1 实验材料.....	18
2.2.2 实验仪器.....	18
2.3 实验方法.....	19
2.3.1 重组质粒设计.....	19
2.3.2 引物设计.....	19
2.3.3 PCR	20
2.3.4 PCR 产物纯化	21
2.3.5 PCR 产物连接	22
2.3.6 连接产物纯化.....	22
2.3.7 重组质粒的转化.....	22
2.3.8 挑取单克隆.....	22
2.4 实验结果及讨论.....	23
2.4.1 连接结果.....	23
2.4.2 连接产物纯化.....	24

2.4.3 重组质粒构建.....	24
2.5 本章小结.....	25
第 3 章 靶向编辑器对 S 蛋白的去糖基化编辑效果验证	26
3.1 引言.....	26
3.2 实验材料及仪器.....	26
3.2.1 实验材料.....	26
3.2.2 实验仪器.....	27
3.3 实验方法.....	28
3.3.1 质粒转染.....	28
3.3.2 细胞总蛋白提取.....	28
3.3.3 BCA 蛋白浓度测定	29
3.3.4 蛋白样品制备.....	29
3.3.5 蛋白质免疫印迹实验.....	29
3.3.6 蛋白质免疫共沉淀.....	30
3.4 实验结果及讨论.....	31
3.4.1 蛋白浓度测定结果.....	31
3.4.2 蛋白质免疫印迹实验结果.....	34
3.4.3 蛋白质免疫共沉淀结果.....	38
3.5 本章小结.....	39
第 4 章 靶向编辑器对假病毒组装、膜融合及侵染的影响	41
4.1 引言.....	41
4.2 实验材料及仪器.....	41
4.2.1 实验材料.....	41
4.2.2 实验仪器.....	42
4.3 实验方法.....	42
4.3.1 假病毒包装.....	42
4.3.2 假病毒浓缩.....	43
4.3.3 假病毒滴度测定.....	43
4.3.4 假病毒侵染.....	44
4.3.5 膜融合.....	45
4.3.6 线粒体膜电位检测.....	46
4.4 实验结果及讨论.....	47
4.4.1 假病毒滴度测定结果.....	47
4.4.2 假病毒侵染结果.....	48
4.4.3 膜融合结果.....	50
4.4.4 线粒体膜电位检测结果.....	51
4.5 本章小结.....	53
第 5 章 靶向编辑器对新型冠状病毒 S 蛋白稳定性的影响	54

5.1 引言.....	54
5.2 实验材料及仪器.....	54
5.2.1 实验材料.....	54
5.2.2 实验仪器.....	55
5.3 实验方法.....	55
5.3.1 质粒转染.....	55
5.3.2 细胞加药处理.....	55
5.3.3 总蛋白提取.....	56
5.3.4 BCA 蛋白浓度测定	56
5.3.5 蛋白样品制备.....	56
5.3.6 蛋白质免疫印迹实验.....	56
5.3.7 细胞活性检测.....	56
5.4 实验结果及讨论.....	57
5.4.1 BCA 蛋白浓度测定结果	57
5.4.2 靶向编辑器对 S 蛋白稳定性影响	60
5.4.3 细胞活性检测结果.....	64
5.5 本章小结.....	65
第 6 章 结论与展望	66
6.1 结论.....	66
6.2 展望.....	67
参考文献.....	68

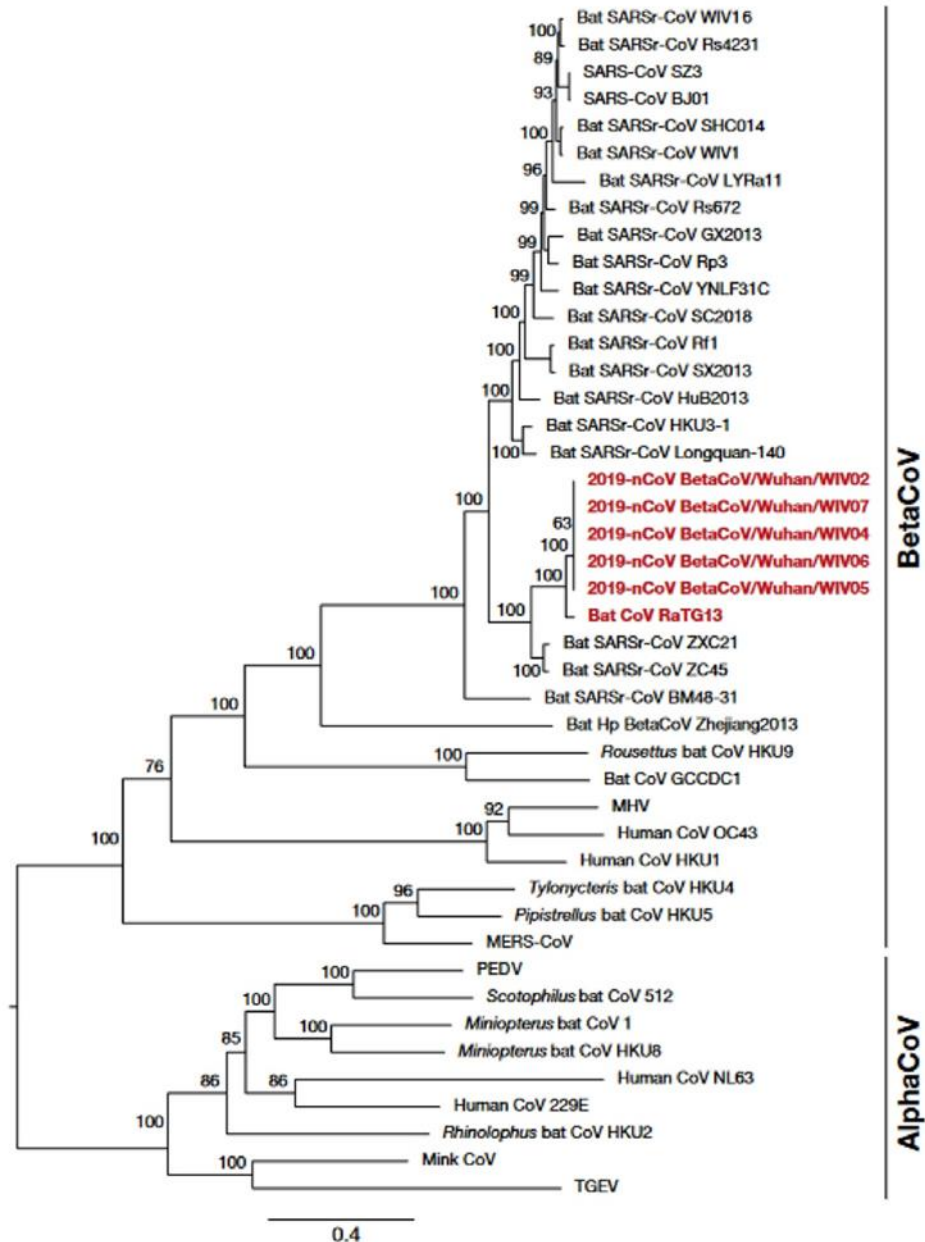
第1章 绪论

1.1 新型冠状病毒

1.1.1 新型冠状病毒的简介

2019 年在全球范围内流行的新型冠状病毒肺炎（COVID - 19）是一种传染性呼吸道疾病。新型冠状病毒（SARS - CoV - 2）是导致 COVID - 19 的病原体，COVID - 19 在全球的大规模传播给全球的经济和人类健康造成了重大的伤害。但这并非首次发现冠状病毒可以对人类健康造成威胁，此前的严重急性呼吸综合征（severe acute respiratory syndrome, SARS）和中东呼吸综合征（Middle East respiratory syndrome, MERS）与 2019 年 COVID - 19 的病原体都属于冠状病毒，它们都同属网巢病毒目冠状病毒科的 β - CoV。在武汉肺炎疫情早期，科学家从 5 例 SARS - CoV - 2 感染的患者中获得了完整的基因组序列，这些基因组序列与 SARS - CoV 的序列一致度为 79.5%^[1-4]。但是，SARS - CoV - 2 不同于 SARS - CoV，它被认为是一种新型的乙型冠状病毒属，而后来科学家们将 SARS - CoV - 2 全长基因组序列与乙型冠状病毒属的其他病毒基因组进行了比对，结果表明，SARS - CoV - 2 与蝙蝠 SARS 样冠状病毒株 BatCov RaTG13 的亲缘关系最近，一致度为 96%。这些研究暗示 SARS - CoV - 2 可能来源于蝙蝠或者是由 RaTG13 病毒自然进化而来^[5]（图 1.1）。

SARS - CoV - 2 是一类具有脂质包膜的正链单股 RNA 病毒。RNA 病毒的特点是单链核酸形成基因链，因此，此类病毒特别容易发生突变，突变后其蛋白质表型会发生变化同时会产生很多不同的亚型，例如属于 RNA 病毒的流感病毒常常会有 H5N1、H5N7、H7N9 等多种亚型，都是由于核酸变异导致。而新冠病毒的变异速度同样非常惊人，2020 年 7 月，第一个被发现新冠病毒关键突变体 D614G 占领全球，拉开了新冠病毒变异的序幕，随后新冠病毒以惊人的速度变异出了 Alpha、Beta、Gamma、Delta、Omicron 等毒株。新冠病毒的各种变异毒株在全球大规模的传播，对世界的有序发展造成了极大的威胁。

图 1.1 SARS - CoV - 2 的进化分析^[5]

1.1.2 新型冠状病毒结构

新型冠状病毒颗粒由核衣壳蛋白（N 蛋白）、膜蛋白（M 蛋白）、囊膜蛋白（E 蛋白）和刺突蛋白（S 蛋白）四种结构蛋白构成^[6]（图 1.2）。

N 蛋白：基因组 RNA 和磷酸化 N 蛋白相互缠绕组成螺旋对称的核衣壳。核衣壳包被在磷脂双层膜内，维持基因组结构的稳定性，在病毒 RNA 的复制、合成过程中发挥重要作用。同时，N 蛋白在病毒的结构蛋白中所占比例最大，保

守程度高。研究表明，2019 - nCoV 的 N 蛋白可以起到对抗宿主细胞中抗病毒 RNA 干扰的作用，避免病毒 RNA 在感染细胞中被破坏^[7]。

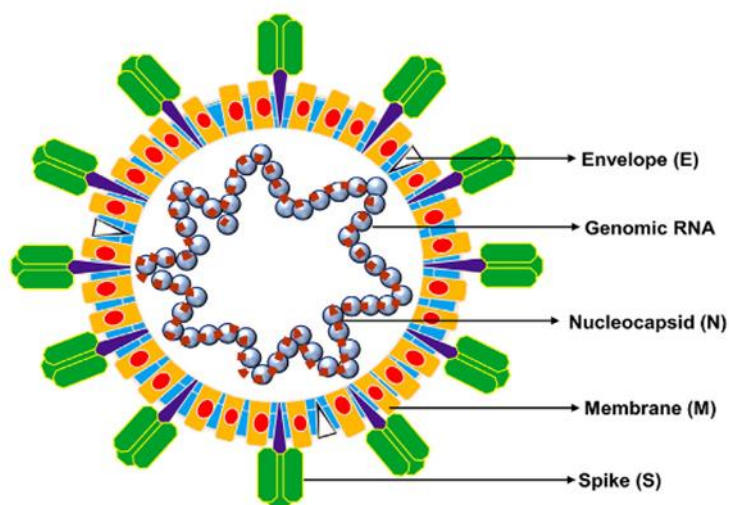


图 1.2 SARS - CoV - 2 结构图^[6]

M 蛋白：M 蛋白包含 1 个保守结构域和 3 个跨膜结构域，是病毒包膜的重要组成部分，并参与病毒组装和释放过程，M 蛋白与 N 蛋白相互作用包被病毒的基因组 RNA。SARS - CoV 的 M 蛋白已被证明可诱导细胞凋亡。M 蛋白存在两种构象变化，可对其他结构蛋白（如 S 蛋白、E 蛋白、N 蛋白）的结构稳定和功能起到重要作用^[8, 9]。

E 蛋白：E 蛋白包含跨膜 α 螺旋结构域和疏水结构域，是病毒包膜组成部分，并参与病毒的组装和释放过程^[10]。E 蛋白在 2019 - nCoV 病毒复制和致病过程中具有功能多样性，并以五聚体结构的形式发挥离子通道作用^[11, 12]。

S 蛋白：S 蛋白是一类较大的三聚体跨膜糖蛋白，S 蛋白以多拷贝的方式插入到病毒粒子表面膜上，覆盖在病毒表面使其具有冠状结构外观。S 蛋白由 S1 与 S2 两个蛋白亚基组成。S1 亚基包含 1 个信号肽、受体结合结构域（receptor binding domain, RBD）和 N 端结构域（N - terminal domain, NTD），负责和宿主细胞受体结合。S2 亚基包含融合肽（fusion peptide, FP）、七肽重复序列（heptad repeat, HR）、跨膜结构域和胞内结构域，可促进病毒膜与细胞膜融合（图 1.3）。在新型冠状病毒 4 种结构蛋白中，S 蛋白在病毒感染和传播方面发挥

着不可忽视的作用。

SARS-CoV-2的S蛋白是一种I型膜蛋白，是由两个结构亚基（S1和S2）组成的三聚体蛋白，主要的功能结构域包括NTD、RBD、CTD（C-terminal domain）等。在S蛋白中，各个结构域各司其职，对于病毒的存亡都发挥着十分重要的作用。①NTD：NTD主要由4个堆叠的 β -折叠和多个连接的柔性环组成，含有多个N-连接的聚糖。NTD是否在SARS-CoV-2进入宿主细胞过程中发挥功能尚不清楚。但是，NTDs可以促进HCoV-OC43和牛冠状病毒糖基部分的结合、鼠肝炎病毒与蛋白受体的结合。猪传染性胃肠炎病毒和MERS-CoV的NTD可能促进S蛋白从融合前到融合后的转换。值得关注的是，SARS-CoV-2的NTD常常作为一些强效中和抗体的靶标，这表明它的功能很重要，或者至少位于其他功能关键区域附近^[13-17]。②RBD：RBD有两个亚结构域，一个是由五股反平行的 β -折叠构成的核心结构，两侧有短连接的 α -螺旋；另一个是延伸的loop区域，称为“受体结合特性基序”（RBM），其包裹在核心结构的一条边上，在融合前S三聚体朝向下的构象中与ACE2接触。RBD结构域有两种构象，朝向不同，“向上”或“向下”（图1.4）。在朝向下的构象中，单个RBD与S2亚基及另外两个RBD的中央螺旋束结合，结合过程依赖于来自同一单体的CTD1和来自相邻单体的NTD，所形成的构型部分地封闭了RBM，使其无法进入受体ACE2。当RBD翻转到“向上”构象并充分暴露RBM时，相邻的CTD1和NTD也会发生位移以适应RBD的运动。RBD从“向下”到“向上”构象的转变是受体完全结合的前提条件，RBD也是自然感染或中和抗体疫苗的首要靶标。RBD上有3个主要的非重叠抗原位点，是许多中和抗体的重要靶标。casirivimab抗体，是一种靶向RBD的中和抗体，主要识别RBD的第一个抗原位点RBM的尖端区域，往往表现出显著的直接竞争阻断ACE2结合的效力；imdevimab抗体靶向RBD主要通过识别位于RBD“向下”构象的暴露面来发挥作用，这个暴露面就是RBD的第二个抗原位点；第三个抗原位点，通常被称为“超隐秘位点”，位于RBD的埋入侧，只有当RBD结构域处于“向上”构象才能被完全接触。这些位点共同组成了SARS-CoV-2大多数中和抗体的

抗原表位。③ C 端结构域（包括 CTD1 和 CTD2）：C 端结构域主要由 β - 折叠结构形成。RBD 像是 CTD1 中两个反平行 β 链之间的一个插入区域，CTD1 也可以看作是 CTD2 中两个反平行 β 链之间的插入结构域，因此 CTD1 和 CTD2 在结构上好像一个连续的股线贯穿连接两端的 NTD 和 RBD。CTD1 位于 RBD 的下方，在翻转转换为受体可及状态时需要与 RBD 一起向外旋转。在 S2 中有一个结构元件“融合肽近端区域（FPPR）”紧邻 RBD 的 CTD1 的对侧，可能有助于抑制 RBD 翻转并稳定 S 三聚体的构象。因此，CTD1 像是 RBD 和 FPPR 之间的结构连接，它感知位于 CTD1 两侧的 RBD 和 FPPR 的变化。CTD2 由两个 β - 折叠面堆叠而成，每个 β - 折叠面包含四条链，其中第五条链由 NTD 和 RBD 之间的连接链贡献，其中一条链间包含 S1 - S2 边界处的 furin 切割位点，因此，CTD2 是膜融合所需的 S 蛋白结构重排的关键组分。④ S2 亚基：在预融合构象中，S2 亚基采取的是多肽链大部分围绕中心螺旋形成的三股卷曲螺旋的构象。尤其是卷曲螺旋和部分 HR1 连同由 758 - 784 位残基形成的另一个螺旋组装成一个九螺旋束，这可能有助于 S 蛋白的整体稳定性。HR1 的后半部分和连接中心螺旋和 C 端七肽重复序列 2（HR2）所谓接头的结构域包围了卷曲螺旋的底部，部分保护了融合肽。

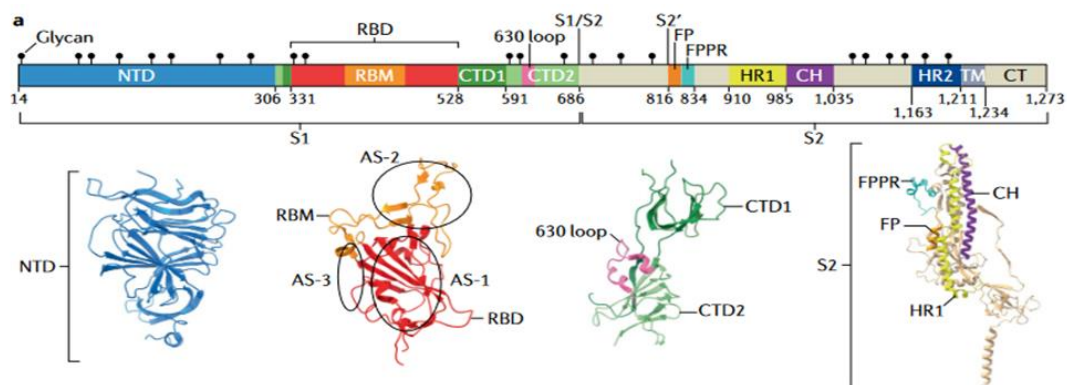


图 1.3 Spike 蛋白及其亚单位的结构^[18]

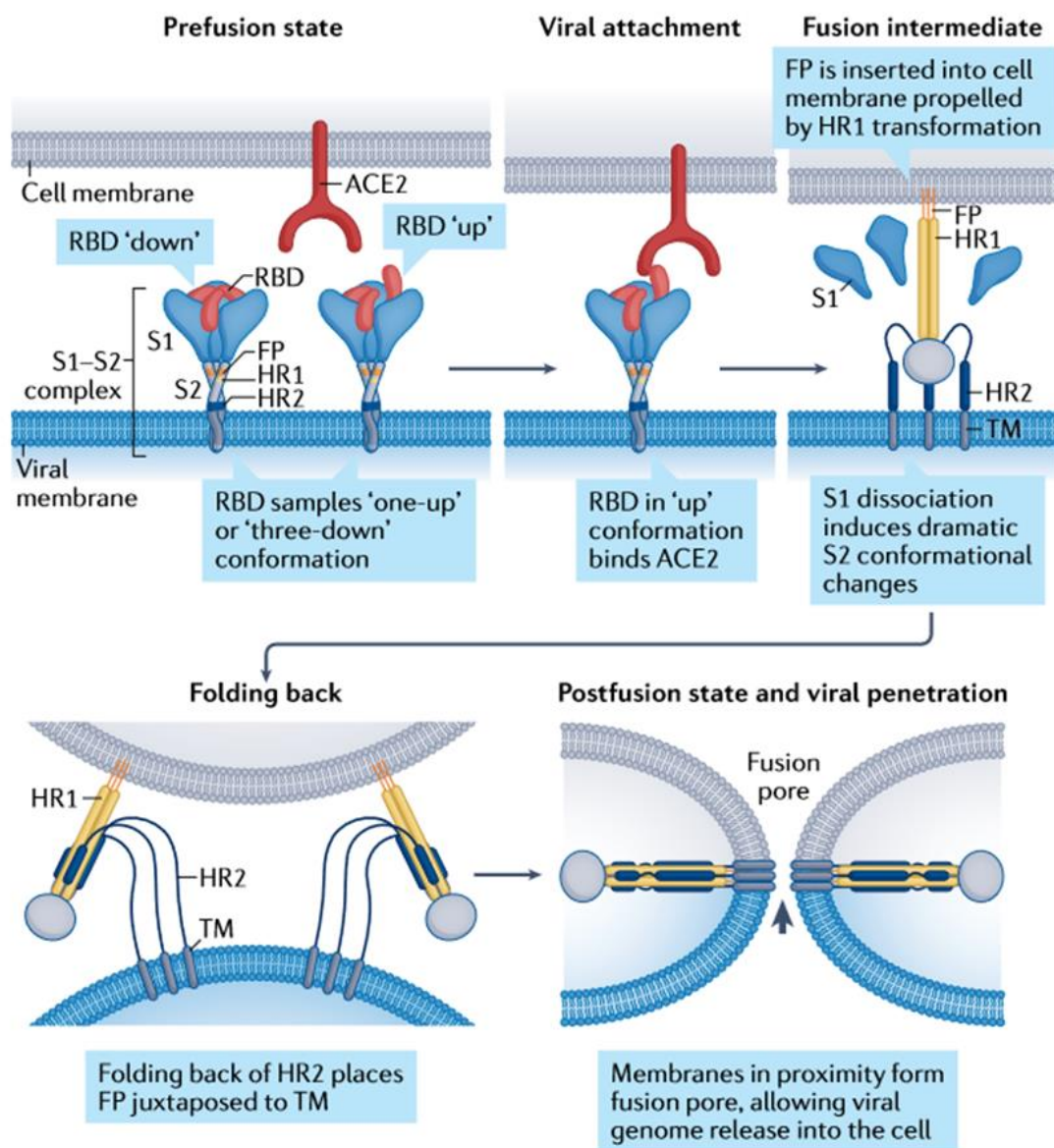
1.1.3 新型冠状病毒感染宿主细胞机制

新型冠状病毒颗粒侵入宿主细胞的步骤包括：与宿主细胞膜的识别、粘附和融合、前融合构象的形成、融合孔的形成和病毒基因组 RNA 的释放。因为新

型冠状病毒 S 蛋白具有促进膜融合的结构组织以及构象变化特性，因此，病毒与宿主细胞膜的识别、黏附和融合过程主要是由 S 糖蛋白介导。一些冠状病毒的 S 蛋白在感染细胞的生物合成过程中被切割为 S1 和 S2 亚基，而其他冠状病毒的 S 蛋白只有在到达下一个靶细胞时才被切割。SARS - CoV - 2 与 MERS - CoV 一样，属于第一类切割方式，即新冠病毒的 S 蛋白在从细胞中释放之前被 furin 蛋白酶切割。因此，成熟病毒颗粒的 S 蛋白中 S1 与 S2 由于被剪切所以呈非共价连接，其中 S1 亚基结合 ACE2，S2 亚基将 S 蛋白锚定在膜上，S2 亚基中的融合肽参与病毒感染新细胞的膜融合过程，它与病毒进入宿主细胞的机制息息相关。

SARS - CoV - 2 依靠其专一性 ACE2 受体进入细胞，ACE2 是由 805 个氨基酸组成的羧肽酶，也是锌金属蛋白酶家族的成员，作为肾素 - 血管紧张素 - 醛固酮系统的组成部分，ACE2 是一个强力负调节因子，它可将血管紧张素 1 和血管紧张素 2 切割为血管紧张素和其他肽类底物对抗血管紧张素转换酶（ACE）介导的血管收缩，在心血管系统和许多其他器官中显示出保护作用，因此，ACE2 是许多心脑血管类疾病治疗药物常见的靶点。除此之外，ACE2 也被确定为 SARS - CoV、SARS - CoV - 2 和其他沙粒病毒的主要受体。有研究表明，ACE2 的下调在 SARS 病毒感染后严重肺衰竭的发病机制中起着重要作用。

新型冠状病毒的 S 蛋白与人 ACE2 受体结合后，在其他触发因素的作用下两个亚基构象发生剧烈变化，使病毒和细胞膜结合在一起，如图 1.4，最终形成一个融合孔，病毒可以通过融合孔将基因组输送至宿主细胞的细胞质中。病毒入侵的一个关键触发因素是 S2 亚基内部的一个额外位点的裂解，称为 S2' 位点。病毒与 ACE2 的结合暴露了 S2' 位点，使 S2' 位点在细胞表面被膜丝氨酸蛋白酶 2（transmembrane protease, serine 2, TMPRSS2）切割，切割之后 S1 与 S2 构象发生剧烈改变，S2 表面的疏水性氨基酸被暴露出来随后迅速的插入到附近的宿主细胞膜上，形成了前融合构象，之后 ACE2 介导细胞内吞，S2 介导融合肽的释放形成融合孔，病毒通过融合孔将其基因组 RNA 释放到宿主细胞的细胞质中，并利用宿主细胞的物质为原料不断复制病毒基因组 RNA。

图 1.4 新冠病毒膜融合示意图^[18]

1.1.4 新型冠状病毒流行病学特征

2019 年 12 月下旬，我国出现了群发肺炎病例，经调查致病病原被鉴定为新型冠状病毒，该病原体被命名为 2019 - nCoV，也就是 SARS - CoV - 2。该病毒与 SARS - CoV 和 MERS - CoV 虽然在序列上具有相似性，但是 SARS - CoV - 2

的传染性比 SARS - CoV 和 MERS - CoV 更强。对早期病例的研究发现, 感染 SARS - CoV - 2 所表现出的症状要比感染 SARS - CoV 和 MERS - CoV 所表现出来的症状更严重。SARS - CoV - 2 主要侵染肺泡上皮细胞, 感染后病毒潜伏期约为 1 - 2 周, 最长可潜伏长达 24 天。该病毒的传播速度较快, 主要通过飞沫、空气、接触病毒污染物等方式进行传播。

感染新冠病毒后, 有极少数人为无症状感染者^[19,20], 大部分人在感染新冠病毒之后会表现出和普通感冒相似的症状, 如发烧、咳嗽、肌肉酸痛、咽喉痛、嗅觉或者味觉异常、腹泻等症状, 严重者会出现呼吸衰竭, 休克以及多器官功能障碍^[19-21]。据研究表明, 病毒感染后患者的症状与年龄以及是否患有基础疾病有着非常密切的关系^[22-24]。年龄对新冠病毒感染具有决定性因素, 基于中国数据的建模研究发现, 新冠病毒感染者的住院率与年龄呈正相关, 20 - 29 岁为 1%, 50 - 59 岁为 4%, 80 岁以上为 18%。年龄也直接决定病死风险, 70 - 79 岁和 80 岁及以上人群的病例病死率分别为 8% 和 15%。英国的一项分析结果显示, 80 岁及以上人群的死亡风险是 50 - 59 岁人群的 20 倍。一项针对 300,000 例 COVID - 19 确诊病例的分析指出, 当感染新冠病毒的患者患有以下一种或多种疾病, 包括心血管疾病、糖尿病、高血压、慢性肺部疾病、以及癌症时, 基础病感染者的死亡率是无基础病感染者死亡率的 12 倍^[25]。目前为止, 世界卫生组织用希腊字母阿尔法 α 、贝塔 β 、伽马 γ 、德尔塔 δ 以及奥密克戎 $\omicron$ 对突变株进行命名, 发现德尔塔 δ 突变株在 2021 年约占全球新型冠状病毒传播的 90%, 而随后出现新突变株奥密克戎, 由于它的 RBD 结构域存在大量突变, 更容易产生免疫逃逸现象, 病毒的感染性更强, 感染者的症状潜伏期也更短^[26], 也对人类的生命健康造成了更加严重的威胁。

1.1.5 治疗新型冠状病毒感染的方法

由于新型冠状病毒的传播速度快, 传播范围广, 研制出能够对抗病毒感染的手段被迫切需求。在无数科研人员的努力下, 开发了许多对抗新型冠状病毒有效的方法, 以下对目前两种主流的治疗方法进行简单的介绍。

① 抗体治疗：在新型冠状病毒入侵宿主细胞的机制中，新型冠状病毒 S 蛋白对于病毒侵入宿主细胞发挥了重要作用，其中 S 蛋白的 RBD 结构域是病毒入侵宿主细胞必不可少的关键要素，因此，抗体治疗主要靶向新冠病毒 S 蛋白三聚体的 RBD 结构域，治疗抗体包括 CR3022^[27]、B38^[28]、CB6 - Fab^[29]等。

② 小分子抑制剂：许多小分子化合物被研究发现具有抑制病毒感染的效果，比如瑞德西韦、甲磺酸卡莫司他、卡莫氟等。瑞德西韦是一种腺苷类似物，能有效地抑制 RNA 聚合酶的活性。体外实验显示，瑞德西韦具有广谱的抗病毒效果，其通过影响 nsp12 - nsp7 - nsp8 复合物的功能来抑制 RNA 之间的相互作用达到抑制病毒感染的效果^[30]；甲磺酸卡莫司他主要通过抑制跨膜丝氨酸蛋白酶 2 的活性来抑制其对 S 蛋白上 S2' 位点的切割，阻止膜融合的发生从而抑制病毒的感染^[31]；卡莫氟是一种蛋白酶抑制剂，它可以抑制与新型冠状病毒感染相关的蛋白酶的活性，抑制病毒对宿主细胞的损害^[32]。

1.2 蛋白质 N - 糖基化

1.2.1 蛋白质 N - 糖基化功能简介

蛋白质糖基化是蛋白质翻译后修饰最常见的方式之一，多种单糖和多糖可以连接到一系列氨基酸残基上。根据蛋白质骨架与聚糖之间糖键的类型，可以将糖基化区分为 N - 糖基化、O - 糖基化、C - 糖基化、S - 糖基化以及 P - 糖基化，其中 N - 糖基化是最常见的糖基化类型之一。N - 糖基化的特点是在 Asn - X - Ser / Thr 序列中，聚糖的 N - 乙酰葡萄糖胺（GlcNAc）与天冬酰胺（Asn）酰胺基团的氮之间形成 N - 糖苷键，其中 X 是除脯氨酸以外的任何氨基酸^[33, 34]。真核生物的糖基化系统在内质网（endoplasmic reticulum, ER）和高尔基体（Golgi）的蛋白加工过程中发挥着关键的作用。N - 糖基化包含多种结构亚型，包括高甘露糖型、复合型、杂合型、核心岩藻糖基化型、非核心岩藻糖基化型等。它们影响着许多生物学过程，如蛋白的生物合成、蛋白稳定性、细胞内运输、亚细胞定位和配体 - 受体相互作用等。

1.2.2 新型冠状病毒的 N - 糖基化

在 2019 年新冠席卷全球之际，科学家们对新冠病毒进行了深入的研究，发现病毒的 N - 糖基化修饰在侵染过程中扮演着重要的角色。新型冠状病毒的 S 蛋白被许多的聚糖修饰，其中，经鉴定 S 蛋白中共有 22 个 N - 糖基化位点^[35]（图 1.5）N - 聚糖可以增强其与人 ACE2 受体的识别与结合，促进病毒与宿主细胞的融合。另外，新冠病毒将 N - 聚糖作为盾牌可以躲避机体免疫系统的“捕杀”，造成“免疫逃逸”促进其入侵宿主细胞。因此，减少 S 蛋白的 N - 糖基化修饰是降低新冠病毒感染的必要方法。

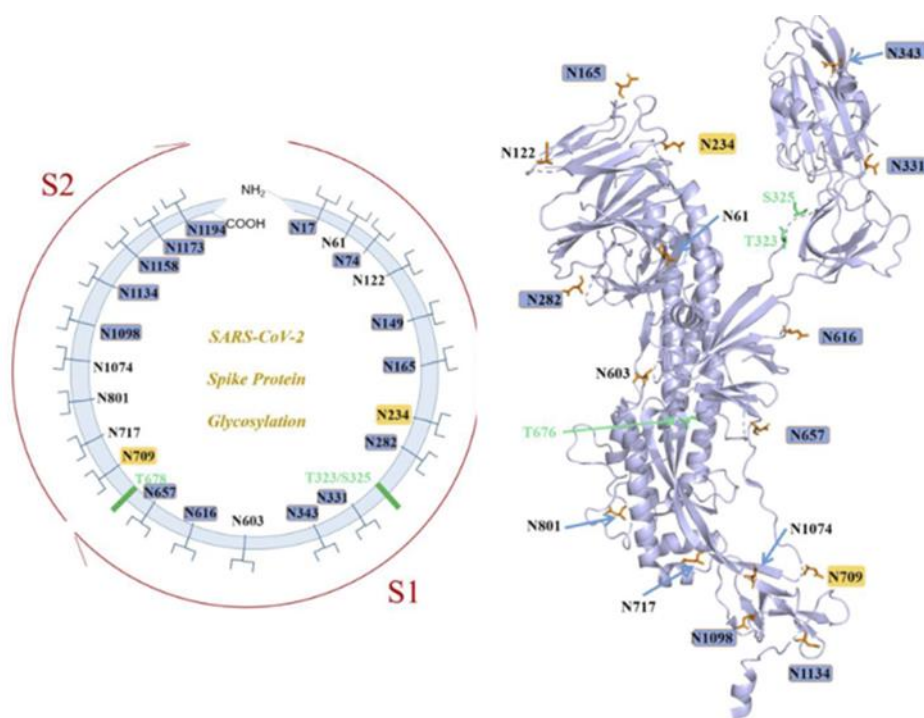


图 1.5 刺突蛋白 Spike 上已知的糖基化位点^[35]

1.3 酵母来源肽 N - 糖苷酶（PNG1）

1.3.1 PNGase 的简介

肽 N - 糖苷酶（PNGase）也叫肽 - N - 天冬酰胺酶，是可以从糖蛋白中完整

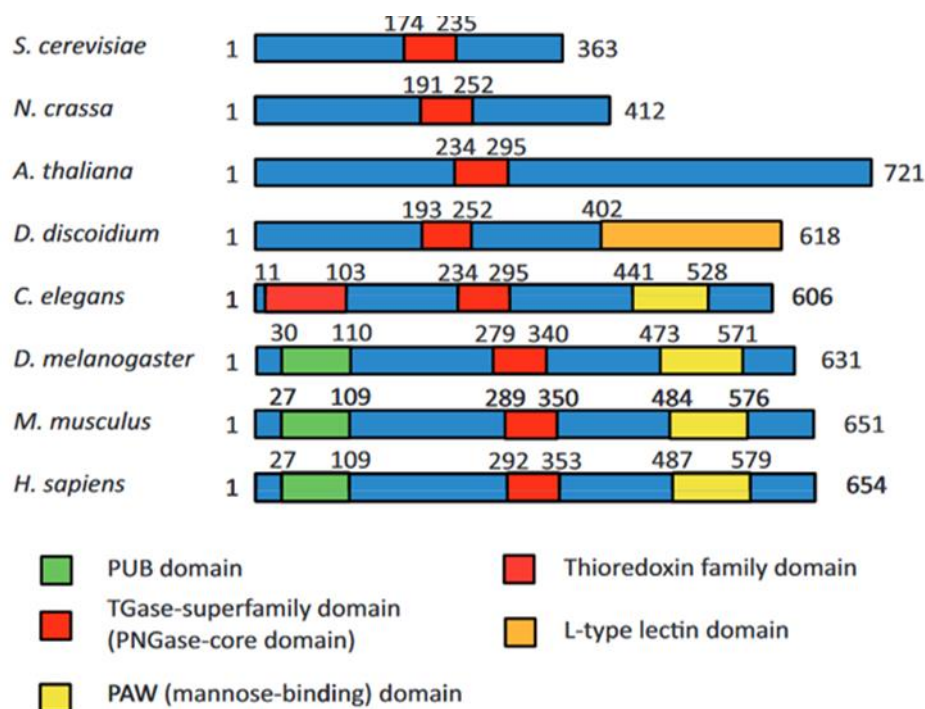
切割 N - 糖链的一类酰胺酶，主要催化糖蛋白与 N - 糖链间酰胺键断裂。PNGase 在原核以及真核生物中都有分布，其主要参与内质网相关降解过程，能对错误折叠的糖蛋白进行识别和去糖基化修饰，促进蛋白质的降解，对蛋白质的质量控制发挥着很重要的作用。除此之外，PNGase 还介导了一些与蛋白酶体相关转录因子的信号激活^[36, 37]。

1984 年 Plummer 等人在在脑膜炎败血伊丽莎白菌 (*Elizabethkingia meningoseptica*, EM)，又称为脑膜炎脓毒黄杆菌 (*Flavobacterium meningosepticum*) 中发现了 PNGase，被命名为 PNGase F，后续在 EM 中又发现了第二个 PNGase F，命名为 PNGase F - II。

1991 年 Suzuki 从青鳉鱼胚胎中发现了动物来源的 PNGase，不久后他们又在体外培养不同来源的哺乳动物细胞胞质中鉴定到了具有完全不同酶学性质的 PNGase，将其命名为 NGLY1。1998 年 Suzuki 等人在酿酒酵母中发现了具有 PNGase 活性的酶，将其命名为 PNG1。后来的研究发现 PNG1 具有将未折叠的蛋白和糖肽从内质网 (ER) 逆行转运到胞质溶胶中功能，并参与这些蛋白分子降解的早期步骤^[38]。

1993 年，在小鼠和人体内发现了 PNGase，被命名为 Ngly1 和 NGLY1。随着对 Ngly1 和 NGLY1 研究的不断深入，发现其与机体的生理病理过程高度相关。缺乏 Ngly1 和 NGLY1 的小鼠和人都会出现一些异常症状，专家将其称为“Ngly1 / NGLY1 缺陷症”。患有 Ngly1 缺陷症的小鼠与正常小鼠相比常常表现出胚胎致死、发育迟缓、肌肉痉挛等症状。而患有 NGLY1 缺陷的症患者常常具有智力障碍、泪失禁等症状。因此，近年来随着对 NGLY1 研究的不断深入，发现 NGLY1 可以作为治疗疾病的潜在靶点。

虽然 PNGase 在真核以及原核生物中都有广泛分布，且不同物种中的 PNGase 都是具有酰胺酶活性的同工酶，但是其不同生物中的序列结构存在较大差异 (图 1.6)，导致不同物种中 PNGase 的酶学性质、以及结构都各不相同，而本文主要针对酵母来源的 PNG1 展开一系列研究。

图 1.6 真核生物 (PNGase) 的结构^[39]

1.3.2 PNG1 的结构与催化机制

PNG1 属于转谷氨酰胺酶超家族的成员，是由 363 个氨基酸组成的去糖基化酶，由 Cys60、His206 和 Asp118 组成的催化三联体对其酶活性至关重要。

2009 年，赵刚^[40]等人将壳二糖与 PNG1 形成复合物，并从复合物的晶体结构中解析了酵母 PNG1 蛋白结构（图 1.7）。壳二糖相互作用残基（图中短棒显示）在底物结合中发挥了关键作用，说明有效的寡糖结合是 PNG1 发挥活性所必需的。PNG1 为单体酶，并且是锌离子金属酶，其蛋白质结构主要由三部分构成：核心结构域、锌离子（ Zn^{2+} ）结合结构域、Rad23p 结合结构域。PNGase 的核心结构域在图中为蓝色标记，它是 PNG1 发挥去糖基化酶活性的关键区域； Zn^{2+} （红黄色表示）结合的 PNG1 锌结合结构域在图中用浅蓝色表示，由 5 个 β -折叠（S1、S2、S3、S4、S5）和 2 个 α -螺旋（H7、H8）组成。即便 Zn^{2+} 在空间上距离 Zn^{2+} 结合结构域较远，但是 Zn^{2+} 对于维持 PNG1 的稳定性十分重要。有研究表明将 Zn^{2+} 去除后，其蛋白稳定性显著降低，在后续补充铜离子、钴离子以及锌离子的实验中 PNG1 的稳定性均不能恢复；Rad23p 结合结构域（绿色

表示)存在4个富含疏水性氨基酸的 α -螺旋(H1、H2、H3、H4)。PNG1与Rad23p结合所形成的复合物在许多真核生物中都存在,主要介导错误折叠蛋白质的降解过程。

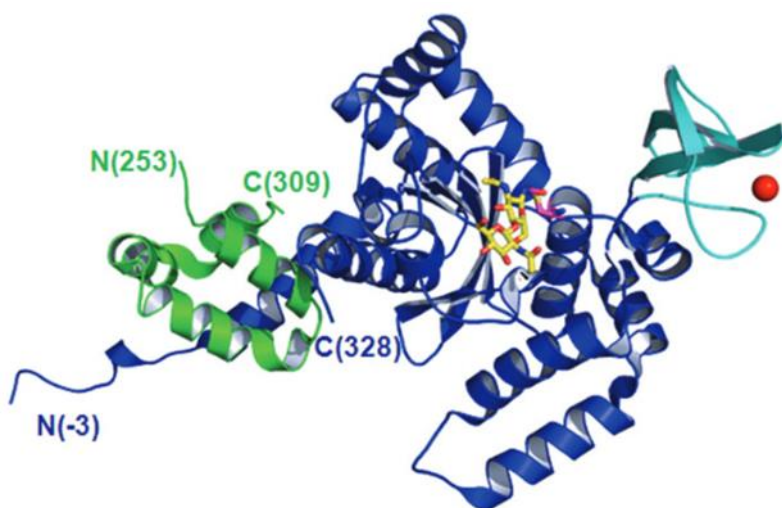


图 1.7 酵母 PNG1 的蛋白结构^[40]

PNG1催化蛋白质近端N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)残基与天冬酰胺残基之间的酰胺键水解,生成含天冬氨酸残基的多肽链和一分子游离1-氨基-GlcNAc寡糖(图1.8)。基于PNG1的催化机制,许多人将其作为去除N-聚糖的工具酶。传统去除N-聚糖的方法主要是化学法,但是去除过程中可能会导致蛋白质的损伤影响后续的研究工作。相比于化学法,应用PNG1可以在更温和的条件下从蛋白质上释放N-聚糖,既能够有效去除N-聚糖又不会对游离蛋白质造成损伤。

1.3.3 PNG1 的改造

已有的研究发现将酿酒酵母来源的PNG1(命名为ScPNG1)的Rad23p结合结构域中4个 α -螺旋(H1、H2、H3、H4)分别切除后所表达出来的蛋白中,只有ScPNG1- Δ H1提高了其对变性糖蛋白的酶活性,并且出乎意料地,对天然正确折叠的糖蛋白也表现出高度的去糖基化活性,并且相比于野生型蛋白还

表现出了更强的 pH 和温度的耐受性。

本文对 ScPNG1 的 N-末端中 H1 序列删除,进行了人源密码子优化,并且将其构建到了哺乳动物细胞表达载体中,并通过中间连接子在 ScPNG1 Δ H1 的 N-末端连接靶向新型冠状病毒 S 蛋白的高亲和力小肽,从而验证了其在哺乳动物细胞中对 S 蛋白的靶向去糖基化编辑效果。

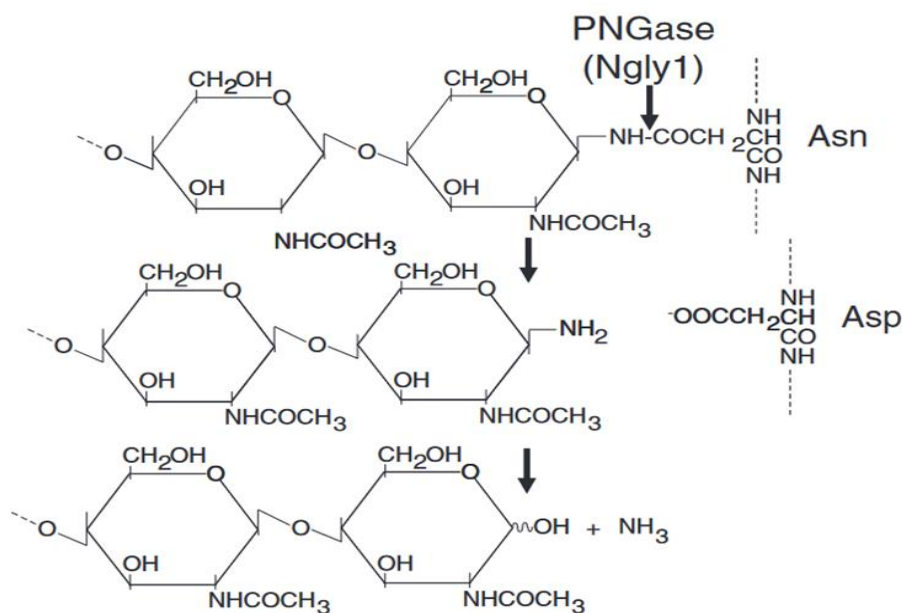


图 1.8 PNG1 的催化机制^[39]

1.4 本文立题依据与主要研究内容

1.4.1 立题依据

糖基化是真核生物的翻译后修饰方式之一,在糖基转移酶的作用下将糖转移至蛋白质,与蛋白质上的氨基酸残基形成糖苷键,糖基化过程起始于内质网,结束于高尔基体。细胞表面糖基化涉及 N-聚糖、O-聚糖、糖基磷脂酰肌醇锚、糖胺聚糖、糖脂等。N-糖基化包含多种结构亚型,包括高甘露糖型、复合型、杂合型、核心岩藻糖基化型、非核心岩藻糖基化型和二分型等,生物学活性也多样,如蛋白的生物合成、蛋白稳定性、细胞内运输、亚细胞定位和配体-受体相互作用等。N-聚糖在许多疾病中同样也扮演着重要的角色。在新型冠状病毒

毒侵染人体细胞过程中，病毒利用 N - 聚糖作为盾牌来躲避抗体，造成“免疫逃逸”入侵宿主细胞。在肿瘤细胞内，高度 N - 糖基化的程序性死亡配体蛋白 1（PD - L1）利用 N - 聚糖维持自身的稳定性，并增强与 PD - L1 受体（PD - 1）的相互作用，进而逃避 T 细胞的免疫追杀。

PNG1 作为一种糖酰胺酶，它的去糖基化活性介导错误折叠蛋白的识别，并参与其内质网相关降解的过程。最近的研究还显示，在哺乳动物细胞内 PNG1 的同系物 NGLY1 可以作为一种蛋白质“编辑酶”可对糖蛋白去除聚糖，使原来的天冬酰胺残基（N）转变为天冬氨酸氨基（D），发挥激活转录因子的作用，这一依赖于去 N-糖基化的蛋白质序列编辑现象激发了我们对 PNG1 的研究兴趣，希望以 PNG1 为基础开发出能针对目标蛋白序列进行靶向蛋白质序列编辑的新型编辑器

众所周知，膜蛋白具有丰富的糖基化修饰，参与了蛋白的折叠、转运、跨膜、蛋白相互作用、细胞通讯等多种功能，有些膜蛋白的糖基化修饰也会激活炎症通路对机体产生一定的损伤。通过对膜蛋白进行靶向去糖基化编辑，使膜蛋白表面的聚糖被高效去除，抑制糖蛋白所介导炎症通路的激活以及相关转录因子的激活和募集，从而抑制后续的炎症反应。新型冠状病毒的刺突蛋白是一类高度糖基化的病毒膜蛋白，含有 22 个 N - 糖基化修饰位点，S 蛋白上的 N - 聚糖是增强病毒与宿主细胞间识别以及保护病毒免受机体免疫系统攻击的主力军。因此新冠病毒的 S 蛋白是去糖基化序列编辑器很好的测试靶标，通过比较被去糖基化编辑的假病毒与正常假病毒对细胞的侵染效率来说明去糖基化编辑对于新冠病毒感染的抑制作用。

在已知的酰胺酶中，细菌来源的 PNGase F 已经被本实验室构建成了一系列靶向 S 蛋白的蛋白质编辑器，但是经过实验验证发现由于其酶活较高，导致了明显的脱靶效应，对细胞会造成较大程度的损伤，相较于细菌来源的 PNGase F，真核生物酿酒酵母来源的 PNG1 酶活力相对较低，且作为真核生物来源的酰胺酶，不易产生强烈的免疫反应，这也有利于编辑器后续在哺乳动物细胞中的验证。因此，酵母来源的 PNG1 是较有潜力的编辑器候选酶，可用于蛋白质编辑

技术开发。

1.4.2 主要研究内容

本文主要包括两部分内容：第一部分内容是对靶向编辑器进行构建，第二部分内容是对构建成功的靶向编辑器进行功能性验证。

具体实验内容为：

- ① 靶向编辑器的构建。包括应用 PCR、连接、转化等基本的基因工程手段。
- ② 在 S1 以及 S 全长的细胞中对靶向编辑器的去糖基化功能进行验证。
- ③ 通过假病毒滴度检测、病毒侵染能力检测以及膜融合等实验检测靶向编辑器对病毒包装、侵染、以及融合效率的影响。
- ④ 通过蛋白质印迹实验以及加药实验检测去糖基化 S 蛋白的稳定性及降解途径。
- ⑤ 检测靶向编辑器对细胞活性的影响。

第2章 新型冠状病毒S蛋白靶向去糖基化编辑器的构建

2.1 引言

本实验室已针对新型冠状病毒S蛋白构建了细菌来源的靶向编辑器,结果显示对S蛋白有良好的去糖基化编辑效果,但是其存在免疫原性、脱靶率高、对细胞损伤较强等缺点,因此本研究选择了酵母来源的PNG1,试图构建一种细胞毒性较弱且对于S蛋白有较强去糖基化编辑效果的靶向编辑器。

2020年,David Baker^[41]团队发现了对S蛋白具有高亲和力的小肽LCB1。他们利用旋转异构体相互作用场(rotamer interaction field, RIF)在所构建的微小蛋白文库中将微小蛋白与S蛋白分别进行对接,随后筛选出与S蛋白RBD结构域有较强结合作用的微小蛋白。使用计算机模拟手段实现了微小蛋白的从头设计,并将其命名为“LCB1”。LCB1仅由56个氨基酸组成,通过与S蛋白的RBD结构域及其周围的残基进行结合从而抑制S蛋白RBD结构域与人ACE2受体结合,最终降低病毒侵染。此外,在实验中发现LCB1的使用还降低了病毒的免疫逃逸,由于LCB1的体积较小,仅有一个完整抗体分子5%的分子量,在同样的质量下,LCB1所能占据的中和位点是普通抗体的20倍,LCB1的作用效果是迄今报道的最有效单抗的6倍。由于LCB1较高的稳定性以及尺寸较小的优点,它不需要在细胞中进行复杂的折叠就可以正确表达。

2020年,Pranam Chatterjee^[42]同样使用计算机模拟的方式筛选能够与S蛋白RBD结构域具有高亲和力的短肽,并对高亲和力短肽进行单位点突变,最终筛选出与RBD结构域具有最强亲和力的小肽,将其命名为“23mer-A2N”。23mer-A2N由23个氨基酸组成,比LCB1的体积小,是靶向S蛋白RBD结构域更小的短肽分子。

基于前期的文献调研,本实验室将LCB1/23mer-A2N与PNG1相连接,使用传统基因工程手段构建了真核酵母来源的靶向编辑器,将其命名为“LCB1-ScPNG1ΔH1”/“23mer-A2N-ScPNG1ΔH1”。考虑到靶向肽与PNG1之间连接

子可能会影响编辑器的功能，本文构建了 LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1（柔性连接子编辑器）和 LCB1 - (EAAAK)₂ - ScPNG1 Δ H1（刚性连接子编辑器）。

2.2 实验材料及仪器

2.2.1 实验材料

表 2.1 主要实验材料

试剂名称	试剂公司
pcDNA3.1 - ScPNG1 Δ H1 质粒	本实验室
pcDNA3.1 - LCB1 质粒	本实验室
DNA Marker	索莱宝
Fast Pfu DNA 聚合酶	爱博泰克
DNA 连接酶	纽英伦生物技术
质粒小提中量试剂盒	天根生化
琼脂糖凝胶回收试剂盒	天根生化
DNA 纯化回收试剂盒	天根生化

2.2.2 实验仪器

表 2.2 主要实验仪器

仪器名称	生产厂家
PCR 仪	艾本德
电泳仪	上海一恒科技
恒温培养箱	上海福玛
恒温培养摇床	其林贝尔

2.3 实验方法

2.3.1 重组质粒设计

应用 SnapGene 4.1.8 软件设计了以 pcDNA3.1 为载体，全部带有 3×Flag 标签的重组质粒，包括下列四种：

表 2.3 本章所构建的重组质粒名称

编号	名称
①	pcDNA3.1 - ScPNG1ΔH1 - 3×Flag
②	pcDNA3.1 - LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1 - 3×Flag
③	pcDNA3.1 - LCB1 - (EAAAAK) ₂ - ScPNG1ΔH1 - 3×Flag
④	pcDNA3.1 - 23mer - A2N - ScPNG1ΔH1 - 3×Flag

2.3.2 引物设计

在上一步设计好的重组质粒中进行引物的设计，其设计的原则为：

- ① 引物长度一般在 15 ~ 30 bp 之间。
- ② 引物 GC 含量在 40% ~ 60% 之间，T_m 值最好接近 72℃。
- ③ 引物自身及引物之间不应存在互补序列。
- ④ 引物应具有特异性。引物设计完成以后，应对其进行 BLAST 检测。

以上是引物设计的一些基本原则，后续需要根据实际情况对引物进行合理设计。

本文所设计的上下游引物序列见下表：

表 2.4 引物名称与序列

引物名称	上游引物序列	下游引物序列
ScPNG1ΔH1	GGGCCCTCTAGACTCG AGATGAAGGCCGCCC	CAAGGATGACAAGTGAG AATTCCACCAC
23mer - ScPNG1ΔH1	GCTGGCTAGCGCCACC ATGCAGAACAAGAAC	CAAGGATGACAAGTGAG AATTCCACCAC
LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1	GACCCAAGCTGGCTAG CGCCACCATGGACAAG	CAAGGATGACAAGTGAG AATTCCACCAC
LCB1 - (EAAAK) ₂ - ScPNG1ΔH1	GACCCAAGCTGGCTAG CGCCACCATGGACAAG	CAAGGATGACAAGTGAG AATTCCACCAC

2.3.3 PCR

以实验室构建好的 pcDNA3.1 - ScPNG1ΔH1 - 3×Flag 以及 pcDNA3.1 - LCB1 - 3×Flag 质粒为模板进行新质粒构建。PCR 反应体系如下：

表 2.5 PCR 反应体系

试剂	体积 (μL)
PHanta Max Buffer	25
上游引物	2
下游引物	2
DNA 聚合酶	1
模板	10 ng
ddH ₂ O	至终体积 50 μL

将上述体系配制好后涡旋混匀，离心后将 PCR 管转移至 PCR 仪中。PCR 反

应程序如下（根据目的片段的长度分别设置不同的延伸时间）：

表 2.6 PCR 反应程序

反应条件	时间
预备解链温度 95℃	3 min
解链温度 95℃	15 s
退火温度 58℃	15 s
延伸温度 72℃	30 - 60 sec / kb
彻底延伸温度 72℃	5 min
4℃	Forever
反应循环数	30 cycles

2.3.4 PCR 产物纯化

用琼脂糖凝胶电泳确认 PCR 成功后，使用 DpnI 消化模板，消化反应的体系如下：

表 2.7 消化反应体系

试剂	体积 (μL)
PCR 产物	40
10×Quick Cut Buffer	5
DW	2.5
Quick Cut DpnI	2.5

上述体系配制好后放于 37℃ 恒温箱中反应 30 min，30 min 后则消化完成。后续使用琼脂糖凝胶回收试剂盒对消化产物进行回收，回收后应用 Nano drop 对纯化后的基因片段测量浓度以备下一步的连接实验使用。

2.3.5 PCR 产物连接

PCR 以及消化回收后得到的产物为线性的重组体，则需使用 T4 DNA 连接酶将其连接成为环状质粒，由于本实验是将两个目的基因片段插入到载体中，所以根据上一步纯化后各个片段的浓度计算连接实验中每一片段需要的体积。

本实验使用在线计算工具 NEBioCalculator 计算连接实验中目的片段以及载体的体积。

2.3.6 连接产物纯化

连接产物进行琼脂糖凝胶电泳，将单一的目的 DNA 条带切下，放置在 1.5 mL 离心管中，随后按照天根琼脂糖 DNA 回收试剂盒中说明书进行操作。

2.3.7 重组质粒的转化

- ① Mach1 - T1 感受态细胞从 80℃拿出，迅速插入冰中，5 min 后待菌块融化，加入目的 DNA 连接产物，并用手拨打 EP 管底轻轻混匀，冰中静置 25 min。
- ② 42℃水浴热激 45 s，迅速放回冰上并静置 2 min。
- ③ 向离心管中加入 700 μL 不含抗生素的无菌 LB 培养基，混匀后 37℃，200 rpm 复苏 60 min。
- ④ 5000 rpm 离心 60 s，留取 100 μL 左右上清轻轻吹打重悬菌块并涂布到含相应抗生素的 LB 固体培养基中。
- ⑤ 将平板倒置放于 37℃培养箱过夜培养 12 - 16 h。

2.3.8 挑取单克隆

平板在 37℃培养箱中培养 12 - 16 h 后，如果连接转化成功则在平板中会长出单克隆菌落。首先，在洁净工作台中对平板上的单克隆菌落进行画圈标记选出要挑取的单克隆菌落。之后，用 10 μL 小枪头将挑取的单克隆放置 500 μL 含抗生素 LB 培养基的微量离心管中，将离心管转移至 37 摇床，孵育 4 - 6 h，最后吸取 200 μL 菌液送测。

2.4 实验结果及讨论

2.4.1 连接结果

通过已有文献报道,我们了解到截短改造后的 ScPNG1 Δ H1 主要在 30℃对天然或者变性的糖蛋白具有比较高的酶活性,然而尚无关于截短改造后的 ScPNG1 Δ H1 在哺乳动物细胞中的去糖基化效果的报道,因此我们首先构建了一种无靶向性的 pcDNA3.1 - ScPNG1 Δ H1 - 3×Flag 哺乳动物细胞表达质粒,分别在表达 S1 蛋白和 S 全长蛋白的稳定细胞内瞬时表达该质粒,证实了其具有一定的去糖基化编辑效果。为了构建靶向 SARS - Cov - 2 S 蛋白的去糖基化编辑器,我们筛选了两个经过精细计算和实验验证过的对 S 蛋白具有高亲和力的靶向肽 LCB1 和 23mer-A2N,并通过不同类型的连接子与 ScPNG1 Δ H1 融合。由于中间连接子可能会影响编辑器的功能,分别设计了灵活度较大的柔性连接子 GGGGS 和灵活度较低的刚性连接子(EAAAK)₂,将靶向肽、连接子与去糖基化酶三个片段连接,设计了 3 种靶向编辑序列 LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1、LCB1 - (EAAAK)₂ - ScPNG1 Δ H1 和 23mer - A2N - ScPNG1 Δ H1,序列长度见表 2.8,片段连接结果见图 2.1,产物的大小都与理论大小一致。

表 2.8 编辑器基因片段信息

编号	插入片段名称	插入片段长度 (bp)
①	ScPNG1 Δ H1 - 3×Flag	996
②	LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 - 3×Flag	1086
③	LCB1 - (EAAAK) ₂ - ScPNG1 Δ H1 - 3×Flag	1188
④	23mer - A2N - ScPNG1 Δ H1 - 3×Flag	1203

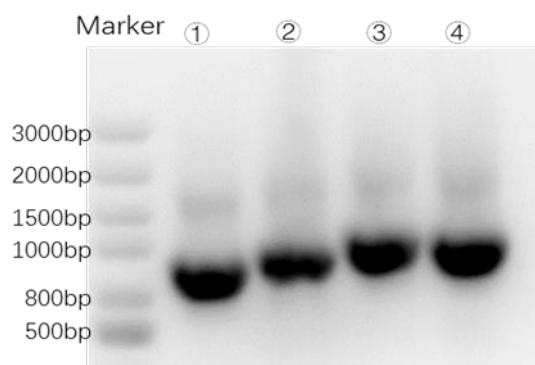


图 2.1 编辑器基因片段核酸结果

2.4.2 连接产物纯化

经过胶回收试剂盒对上一步连接产物进行纯化。所得纯化产物结果如图所示：

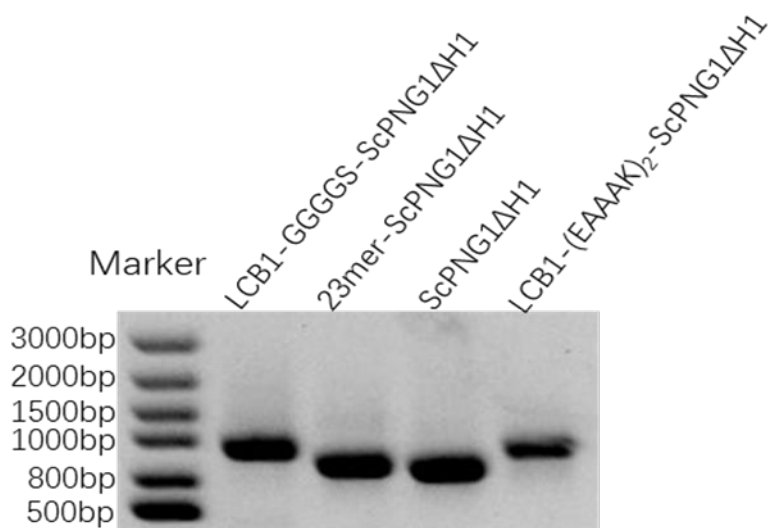


图 2.2 编辑器基因片段纯化结果

2.4.3 重组质粒构建

以上三种纯化后的 PCR 扩增产物通过 Gibson 无缝克隆技术整合进入 pcDNA3.1 载体中，经过大肠感受态转化获得单克隆菌，经 Sanger 测序，证实插入序列与预期一致，3 个靶向编辑器重组质粒 pcDNA3.1 - 23mer - A2N -

ScPNG1 Δ H1、pcDNA3.1 - LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 和 pcDNA3.1 - LCB1 - (EAAAK)₂ - ScPNG1 Δ H1 构建成功，质粒图谱见图 2.3。

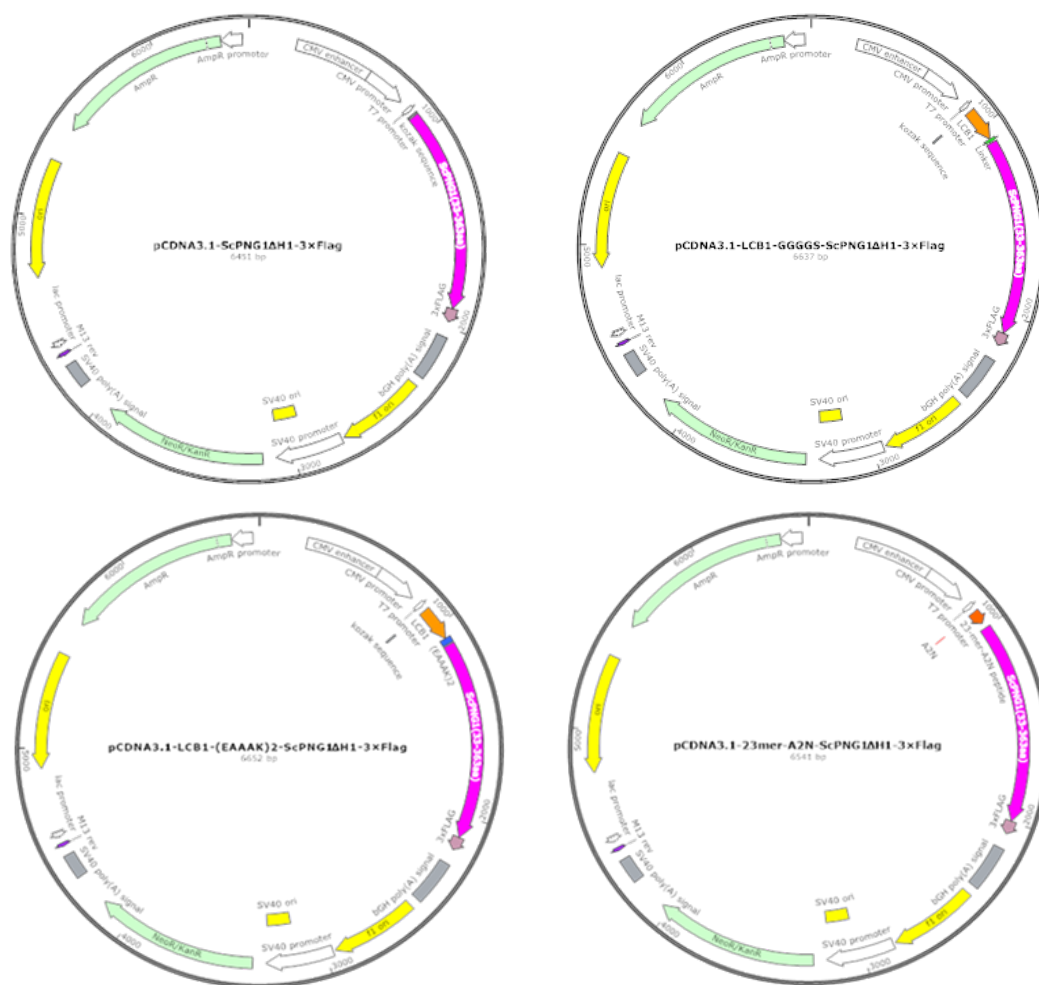


图 2.3 质粒的构建图谱

2.5 本章小结

本章利用 4 对引物，以本实验室已构建的 pcDNA3.1 - ScPNG1 Δ H1 和 pcDNA3.1 - LCB1 序列为模板，使用高保真的 Fast Pfu 进行了目的片段的 PCR，经过连接后获得 3 个重组靶向编辑器基因序列，经连接、连接产物纯化、转化等基因工程手段构建了后续实验所需的带有 Flag 标签的靶向编辑器。经 DNA 测序后，确认靶向编辑器全部构建成功。

第3章 靶向编辑器对S蛋白的去糖基化编辑效果验证

3.1 引言

在新型冠状病毒入侵宿主的过程中，新型冠状病毒 S1 亚基的 RBD 结构域发挥主要作用，本实验室构建了 HEK - 293T - S1 稳定细胞株，此细胞株是以人胚胎肾细胞（HEK - 293T）为宿主表达新冠病毒 S1 蛋白。

病毒全长 S 蛋白在高尔基体表面经 Furin 蛋白酶水解，水解后使 S1 与 S2 以一种非共价键的形式相连，随后被分泌到细胞外。为了模拟 S 蛋白的天然状态，本实验室构建了 293T - S 稳定细胞株，它可以表达天然状态下的 S 全长蛋白。

293T - S - 682M 稳定细胞株是本实验室为测试靶向编辑器功能而构建的另一种细胞株，此细胞株通过把 S1/S2 切割位点的 682 位至 685 位的 RRAR 氨基酸残基突变成 GGSG，使 S1/S2 切割位点失活而不影响蛋白质结构，不会被宿主细胞内的弗林蛋白酶裂解，从而能够获得完整的全长 S 蛋白

本章将靶向编辑器分别转染 HEK - 293T - S1 以及 HEK - 293T - S 的稳定细胞株中，验证靶向编辑器对 S 蛋白的去糖基化效果。新冠病毒 S 蛋白的结构解析结果显示全长的 S 蛋白存在 22 个 N - 糖基化位点，为检测靶向编辑器的编辑位点，本文将编辑器质粒转染到 HEK - 293T - S1 中随后用质谱检测其在 S1 氨基酸序列中的编辑位点，最后在 HEK - 293T - S - 682M 稳定细胞株中对编辑器与 S 蛋白的相互作用能力进行验证。

3.2 实验材料及仪器

3.2.1 实验材料

表 3.1 主要实验材料

试剂名称	试剂公司
HEK - 293T - S1 稳定细胞株	本实验室
HEK - 293T - S 稳定细胞株	本实验室
HEK - 293T - S 稳定细胞株	本实验室
质粒小提中量试剂盒	天根生物
TBS	本实验室
细胞培养基	索莱宝
胰蛋白酶	索莱宝
吐温 80	索莱宝
PBS 缓冲液	索莱宝
高效 RIPA 裂解液	索莱宝
蛋白酶体抑制剂 PMSF	索莱宝
BCA 定量试剂盒	Thermo
MOPS 缓冲液	金斯瑞
Western blot 膜再生液	金斯瑞
蛋白预制胶	金斯瑞
ECL 显影液	碧云天
转染试剂 Lipo8000	碧云天
青 - 链霉素	碧云天
嘌呤霉素	碧云天
快速封闭液	碧云天
脱脂牛奶	碧云天

3.2.2 实验仪器

表 3.2 主要实验仪器

仪器名称	生产厂家
荧光显微镜	德国赛多利斯
低温超速离心机	艾本德
室温离心机	艾本德

续表 3.2

仪器名称	生产厂家
显影仪	赛力斯自动化科技
多功能酶标仪	美谷分子仪器
超净工作台	苏州泰安

3.3 实验方法

3.3.1 质粒转染

① 准备编辑器质粒：pcDNA3.1 - 23mer - A2N - ScPNG1ΔH1（下文中为简化名称，用 pcDNA3.1 - 23mer - ScPNG1ΔH1 替代）、pcDNA3.1 - LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1 和 pcDNA3.1 - LCB1 - (EAAAK)₂ - ScPNG1ΔH1，以 pcDNA3.1 - ScPNG1ΔH1 为对照，汇合度达 70 - 80% 的 HEK - 293T - S1 和 HEK - 293T - S 细胞六孔板，无血清无抗生素的细胞培养基，Lipo8000 转染试剂。

② 转染复合物的配置：将 2 μg 编辑器质粒加入到含有 125 μL 无血清无抗生素细胞培养基的 1.5 mL 微量离心管中，静置 10 min 左右，按照 lipo8000：编辑器质粒 = 1.6：1 比例将 Lipo8000 轻轻地加入到含有编辑器质粒的无血清无抗生素的细胞培养基中，超净台内静置 30 min 左右。

③ 在转染前将六孔板中培养基吸弃，换成无血清无抗生素的细胞培养基。

④ 30 min 之后在超净台中将转染复合物均匀地加入到六孔板中，之后将六孔板转移至 37℃细胞培养箱继续培养 48 h。

3.3.2 细胞总蛋白提取

① 洗涤细胞：转染 48 h 后，将细胞六孔板中的培养基吸弃，用 PBS 缓冲液冲洗细胞两遍，吸弃 PBS 缓冲液。操作时注意动作轻柔不要把贴壁的 293T 细胞冲下。

② 裂解细胞：首先按照高效 RIPA 裂解液：PMSF = 100：1 的比例配置细胞

裂解液。将配置好的细胞裂解液混匀后，按照每孔 200 μL 逐加到六孔板中，裂解时全程冰上操作。

③ 提取总蛋白：冰上裂解 30 min 后，用细胞刮板轻轻将细胞刮下，再将刮下的细胞转移至 1.5 mL 微量离心管中，随后用 4°C 低温超速离心机 15000 rpm，离心 15 min。细胞总蛋白存在上清中，离心后收集上清。

3.3.3 BCA 蛋白浓度测定

BCA 法测蛋白浓度主要依靠两个反应。首先，蛋白质中的肽键在 37°C 时可将硫酸铜中的 Cu^{2+} 还原成 Cu^+ ，一分子的 Cu^+ 离子能与两分子的二喹啉甲酸螯合形成紫色复合物，可强烈吸收 562 nm 波长的光。因此，蛋白质浓度越高其在 562 nm 处的吸光度值就越大。

① 首先使用标准品绘制蛋白标准曲线，横坐标代表吸光度值，纵坐标代表蛋白浓度。

② 将其他蛋白样品的吸光度值带入到标准曲线中，通过换算可以计算出蛋白浓度。

3.3.4 蛋白样品制备

① 取蛋白：确定目标蛋白上样量，根据测定的蛋白浓度结果计算上样体积，随后分别取适量蛋白样品至 1.5 mL 微量离心管中，再对应加入 5×Loading Buffer，加好之后并用蛋白 1×Loading Buffer 补齐每孔之间的体积差异，保证所有蛋白体积一致。

② 加热蛋白样品：将准备好的蛋白样品放置 100°C 金属浴中，加热 10 min。

③ 冷却蛋白样品：加热好的蛋白样品放置室温冷却，冷却后的蛋白样品方可上样。

3.3.5 蛋白质免疫印迹实验

① 上样：10 孔板每孔上样量为 50 μg ，15 孔板每孔上样量为 30 μg ，根据

BCA 法测定的蛋白浓度计算上样体积，并用蛋白 Loading Buffer 补齐每孔之间的体积差异，保证所有胶孔内蛋白体积一定。

② 蛋白电泳：先设置电泳条件为 80 V，10 min，待蛋白到达分离胶后设置电泳条件为 170 V，40 min。

③ 转膜：首先将 PVDF 膜用甲醇活化 30 s，随后用膜平衡液继续活化 10 min 左右。待电泳结束后立即将蛋白胶与 PVDF 膜一起转移至转膜仪，分子量较大蛋白质转膜时间设置为 21 min，分子量较小蛋白质转膜时间设置为 11 min。

④ 封闭：使用脱脂奶粉配置成 5% 的封闭液，待转膜结束后将 PVDF 膜转移至配好的封闭液中。室温孵育 2 h 或者 4℃孵育过夜。

⑤ 孵育一抗：首先用一抗稀释液按照抗体：脱脂奶粉 = 1 : 3000 的比例配置所需抗体。随后将封闭结束的 PVDF 膜用 TBST 冲洗三次，弃去 TBST 后孵育相应的一抗，一抗孵育条件为摇床转速 65 rpm，室温孵育 2 h 或者 4℃孵育过夜。一抗孵育结束后，回收一抗，摇床转速调至 100 rpm，使用 TBST 洗膜，每次 5 min，重复洗膜 3 次。

⑥ 孵育二抗：首先使用脱脂奶粉按照抗体：脱脂奶粉 = 1 : 3000 配置成所需二抗，随后用二抗继续孵育 PVDF 膜，摇床转速 65 rpm，室温孵育 40 min。二抗孵育结束后，回收二抗，摇床转速调至 100 rpm，使用 TBST 洗膜，每次 5 min，重复洗膜 3 次。

⑦ 显影：配置显色液。将 A 液：B 液 = 1 : 1 的比例配置，所得溶液即为显色液。将显影液均匀的滴加到 PVDF 膜的目的条带上，在显影仪中查看 PVDF 膜上的蛋白印迹。

3.3.6 蛋白质免疫共沉淀

① 细胞培养：用 10 cm 培养皿培养 HEK - 293T - S - 682M 细胞（S - M）。

② 转染：待细胞状态较好时，转染编辑器质粒。首先将培养好的 HEK - 293T - S - 682M 细胞的完全培养基吸弃，换成无血清无抗生素的培养基。随后在安全台中将吸取相应体积质粒并加入到 1.5 mL 含有无血清无抗生素细胞培养

基的微量离心管中，加好之后静置 10 min，加入转染试剂 Lipo8000 静置 30 min 使其形成转染复合物，30 min 之后将转染复合物加入到细胞培养皿中，轻轻混匀，随后将细胞转移至 37°C 细胞培养箱，培养 48 h。

③ 提取细胞总蛋白：48 h 后收集细胞，吸弃细胞培养基，在冰上用预冷的 PBS 缓冲液洗涤细胞 1 - 2 次，吸弃 PBS 缓冲液。

根据免疫共沉淀试剂盒的说明书，按照裂解液：蛋白酶体抑制剂 = 100 : 1 的比例配置细胞裂解液。随后每个 10 cm 细胞培养皿加 500 μ L 的细胞裂解液，冰上静置 30 min。

④ BCA 法测蛋白浓度：细胞裂解后用枪头将其转移至 1.5 mL 的微量离心管中，10000 - 14000 g 4°C 离心 5 min。离心后收集上清弃去沉淀。上清用于 BCA 法测蛋白浓度。BCA 法测蛋白浓度后取相同质量，相同体积的蛋白准备与磁珠孵育。

⑤ 准备 FLAG 标签蛋白免疫沉淀试剂盒（磁珠法）按照说明书的指示首先对所需抗体磁珠洗涤：按照 500 μ g 加 20 μ L 磁珠，取适量的磁珠用 1×TBS 轻轻洗涤磁珠，随后放置磁力架上分离磁珠 10 s 弃去废液，此步骤重复 1 - 2 次。

⑥ 蛋白 - 磁珠共孵育：将相同质量相同体积的蛋白与磁珠混合，放置旋转仪中，4°C 过夜孵育。

⑦ 蛋白洗脱：将过夜孵育的蛋白 - 磁珠混合物从旋转仪上取下，转移至磁力架上，将上清吸弃，随后用裂解液轻轻洗涤磁珠 1 - 2 次，弃去废液后收集磁珠，用 40 μ L 的 1×Loading Buffer 洗脱磁珠上的蛋白，随后将蛋白转移至金属浴，100°C 洗脱 10 min。

10 min 后将样品放置磁力架上吸出体系中的磁珠，管中余下溶液为富集编辑器的蛋白样品。随后将样品上样至蛋白胶孔中，最后用 Western Blot 验证 S 蛋白与编辑器的相互作用。

3.4 实验结果及讨论

3.4.1 蛋白浓度测定结果

BCA 法测定蛋白浓度后所绘制的蛋白标准曲线的方程为： $y = 1.442x - 0.5846$ ，方程的 $R^2 = 0.9991$ ，置信度较高。因此使用此方程计算蛋白样品浓度。

表 3.3 BCA 标准品蛋白浓度

OD 值 (562 nm)	浓 度 (mg / mL)
0.434	0.025
0.474	0.125
0.773	0.500
0.919	0.750
1.099	1.000
1.426	1.500
1.805	2.000

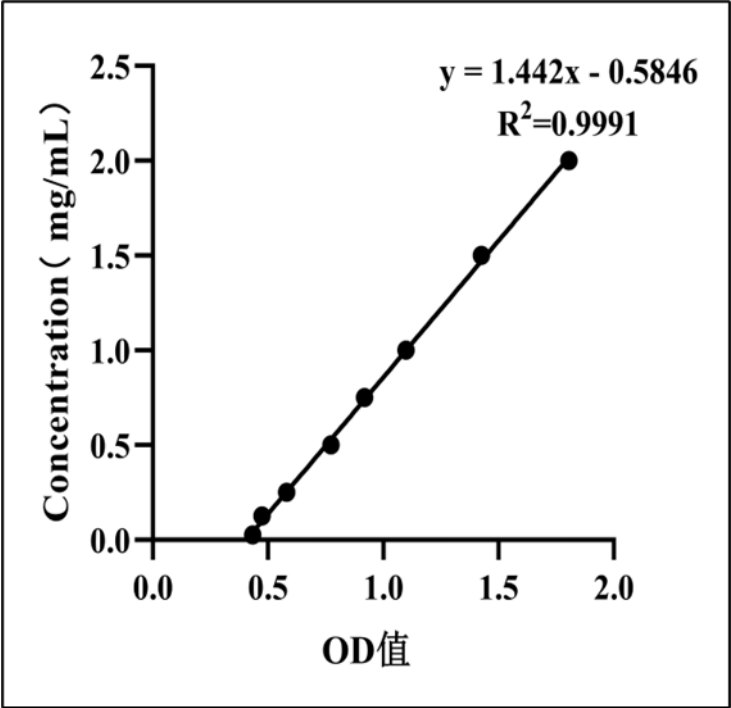


图 3.1 BCA 法测定标准曲线

表 3.4 S1 和 S 蛋白浓度

蛋白名称	OD 值 (562 nm)	浓度 (mg / mL)
S1 - WT	1.195	1.14
S1 - pcDNA3.1	1.339	1.35
S1 - 0.5 μ g - ScPNG1 Δ H1	0.942	0.77
S1 - 1 μ g - ScPNG1 Δ H1	0.890	0.70
S1 - 2 μ g - ScPNG1 Δ H1	0.772	0.53
S1 - 0.5 μ g - 23mer - ScPNG1 Δ H1	0.827	0.61
S1 - 1 μ g - 23mer - ScPNG1 Δ H1	0.821	0.60
S1 - 2 μ g - 23mer - ScPNG1 Δ H1	0.685	0.40
S1 - 0.5 μ g - LCB1 - (EAAAK) ₂ - ScPNG1 Δ H1	0.894	0.70
S1 - 1 μ g - LCB1 - (EAAAK) ₂ - ScPNG1 Δ H1	0.785	0.55
S1 - 2 μ g - LCB1 - (EAAAK) ₂ - ScPNG1 Δ H1	0.751	0.50
S1 - 0.5 μ g - LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1	0.862	0.66
S1 - 1 μ g - LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1	0.763	0.52
S1 - 2 μ g - LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1	0.761	0.51
S - WT	0.898	0.71
S - pcDNA3.1	0.915	0.73
S - 1 μ g - ScPNG1 Δ H1	0.911	0.73
S - 1.5 μ g - ScPNG1 Δ H1	0.851	0.64
S - 1 μ g - LCB1 - GGGGS-ScPNG1 Δ H1	0.803	0.57
S - 1.5 μ g - LCB1 - GGGGS-ScPNG1 Δ H1	1.195	1.14
S - 2 μ g - ScPNG1 Δ H1	1.339	1.35

续表 3.4

蛋白名称	OD 值 (562 nm)	浓度 (mg / mL)
S - 2 μ g - LCB1 - GGGGS-ScPNG1 Δ H1	1.297	1.29
S - 682M	1.208	1.16
S - 682M - LCB1 - GGGGS-ScPNG1 Δ H1	0.943	0.78

3.4.2 蛋白质免疫印迹实验结果

(1) 编辑器质粒转染量的优化

为了探索编辑器发挥去糖基化效果的最适剂量，将四种编辑器质粒按照 0.5 μ g、1 μ g 和 2 μ g 分别转染至 HEK - 293T - S1 中，检测靶向编辑器对 S1 蛋白的去糖基化效果，结果如图 3.2 所示。

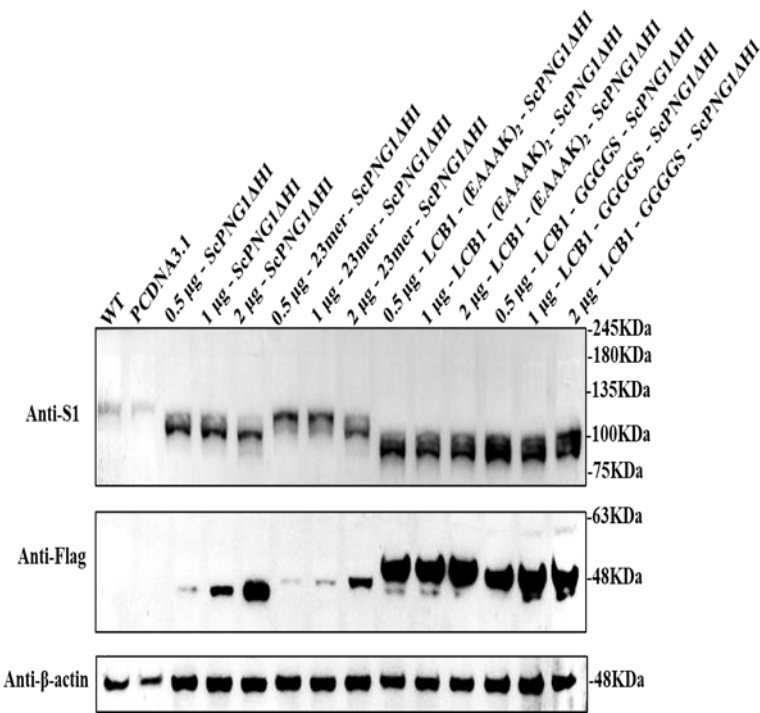


图 3.2 验证不同量编辑器对 S1 去糖基化效果图

实验结果显示去糖基化效果显著依赖于编辑器表达水平，例如表达量较高

的 LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 和 LCB1 - (EAAAK)₂ - ScPNG1 Δ H1 在 0.5 μ g 时就表现出明显的去糖基化效果。而表达量较低的 ScPNG1 Δ H1 和 23mer - ScPNG1 Δ H1 在 2 μ g 时去糖基化效果达到最佳。

由于 LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 表达水平和去糖基化效果良好, 因此我们将空载体作为对照组, 分别把无靶向编辑器 ScPNG1 Δ H1 和靶向编辑器 LCB1- ScPNG1 Δ H1 质粒通过不同质粒浓度梯度瞬时转染 293T - S 稳定株细胞中, 去糖基化编辑结果见图 3.3。

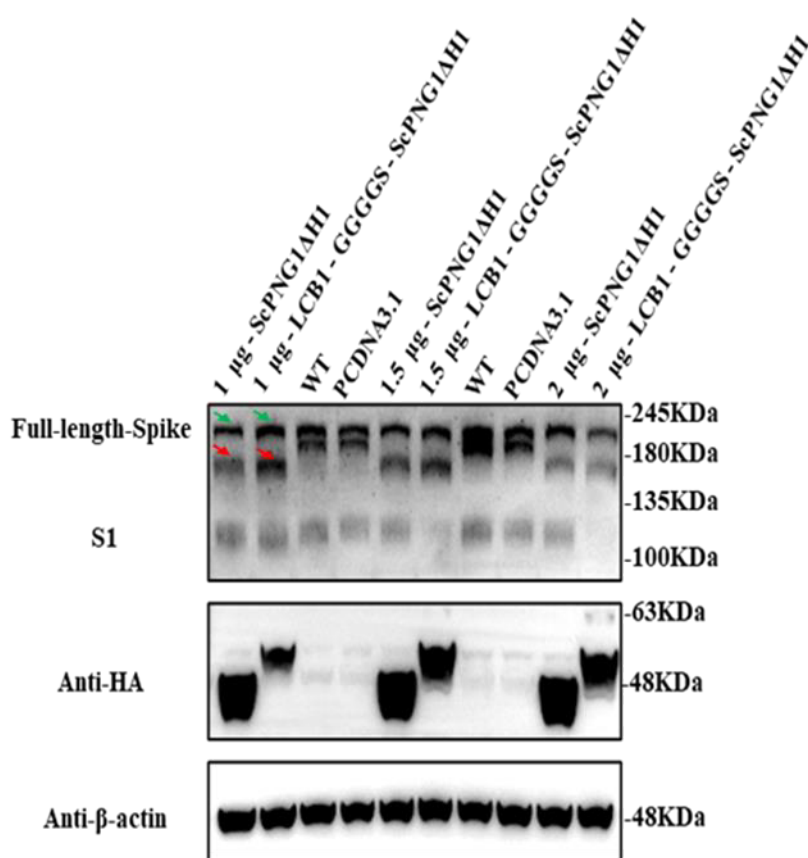


图 3.3 不同质粒量靶向编辑器对全长 S 蛋白的去糖基化效果

实验结果显示, 转入空载和不做任何处理的实验组在 200 KDa 左右有两条带, 我们推断 S 蛋白在哺乳动物细胞内可能存在未完全 N-糖基化修饰的蛋白形式如图所示, 在 135 KDa 和 180 KDa 之间的条带是已经被去糖基化的全长 S 蛋白, 在 100 KDa 和 135 KDa 之间的蛋白条带是经过宿主细胞蛋白酶裂解后的 S1

亚基蛋白。本实验中我们构建了在 ScPNG1 Δ H1 的 C-末端带有 HA 标签蛋白的去糖基化编辑器，通过 HA 标签蛋白量化编辑器的表达水平。通过蛋白印记实验可以明显看出，与表达量很高的 ScPNG1 Δ H1 相比，表达量低的 LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 对于全长 S 蛋白和裂解后的 S1 亚基蛋白都展现出了更好的去糖基化编辑效果，说明 LCB1 的融合使 ScPNG1 Δ H1 对底物 S 蛋白有更深度的靶向去糖基化编辑效果。

(2) 靶向编辑器对 S1 的去糖基化效果

HEK - 293T - S1 细胞可以稳定表达 S1 蛋白。新冠病毒的受体结构域 RBD (Receptor Binding Domain) 存在 S1 蛋白上，此结构域对于病毒侵染发挥着关键作用。分别将四种编辑器质粒都以每孔 2 μ g 转染至 HEK - 293T - S1 细胞中，结果见图 3.4。

S1 的蛋白约为 95 KDa，但是由于聚糖的修饰使得 S1 蛋白的实际分子量要比理论分子量大，在图中 135 KDa 附近的条带代表的是 S1，100 KDa 附近的条带代表的是去糖基化形式的 S1 蛋白。结果显示四种编辑器对 S1 均有一定的去糖基化作用。野生型 S1 和转染空载体的细胞中未去糖基化的 S1 条带在 135 KDa 附近；LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 和 LCB1 - (EAAAK)₂ - ScPNG1 Δ H1 对 S1 的去糖基化效果最明显，去糖基化之后 S1 条带主要分布在 90-110 KDa 之间；而 ScPNG1 Δ H1 和 23mer - ScPNG1 Δ H1 对于 S1 的去糖基化效果不如前两者显著，去糖基化之后 S1 条带分布在 110 - 130 KDa 之间。

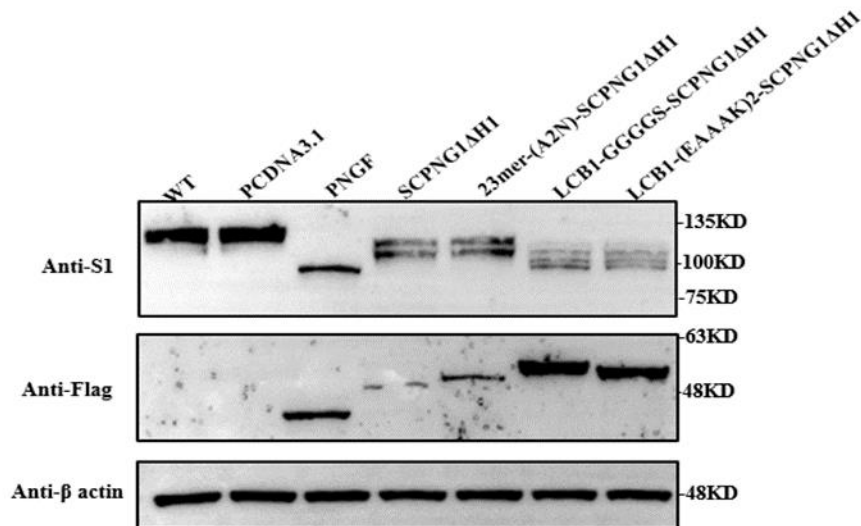


图 3.4 靶向编辑器对 S1 的去糖基化效果

对于以上结果有如下结论：① 三种靶向编辑器对于 S1 表现出了不同的去糖基化效果，靶向编辑器 23mer - ScPNG1 Δ H1 与非靶向编辑对 S1 的去糖基化效果相当，其细胞内表达量较低。LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 和 LCB1 - (EAAAK)₂ - ScPNG1 Δ H1 两种编辑器在细胞内的表达量比较高，对 S1 的去糖基化效果最显著。

② 靶向编辑器使去糖基化形式的 S1 蛋白变得极其不稳定。由于靶向编辑器的加入使 S1 上 N-糖链被去除，去糖基化形式的 S1 亚基的稳定性明显变差，可能加速了 S1 的降解速率，如图所示的蛋白印迹变浅表明靶向去糖基化编辑导致 S1 蛋白在细胞内的蛋白量变少，带有 LCB1 靶向肽的编辑器由于其去糖基化效果最佳，所以使得加入 LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 和 LCB1 - (EAAAK)₂ - ScPNG1 Δ H1 两种靶向编辑器的实验组蛋白质印迹最浅。

（3）编辑器对 S 全长的去糖基化编辑效果

在 HEK - 293T - S 细胞中转染靶向编辑器质粒，图 3.5 中 180 KDa 与 245 KDa 之间的印迹带表示的是全长形式的 S 蛋白条带，135 - 180 KDa 之间的印迹是去除 N-糖链的全长 S 蛋白条带。135 KDa 以下印迹是 S1 蛋白条带。

结果显示：构建的四种编辑器对全长 S 蛋白均有一定的去糖基化作用，其中，LCB1 - (EAAAK)₂ - ScPNG1 Δ H1 和 LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 对 S 蛋白

的去糖基化效果最明显，而 ScPNG1 Δ H1 和 23mer - ScPNG1 Δ H1 对于 S 蛋白的去糖基化效果不如前两者显著，与在 S1 稳定细胞株中获得的结果一致。除此之外，转染编辑器后蛋白印迹相比于对照组显著减少，因此，我们推测编辑器的加入使得 S 蛋白稳定性变差，加速了其降解速率导致。

综上所述，23mer - ScPNG1 Δ H1 对 S1 蛋白以及全长 S 蛋白的去糖基化效果不是十分显著，因此在后续的免疫共沉淀实验中主要针对靶向编辑器 LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 进行编辑位点以及蛋白相互作用的验证。

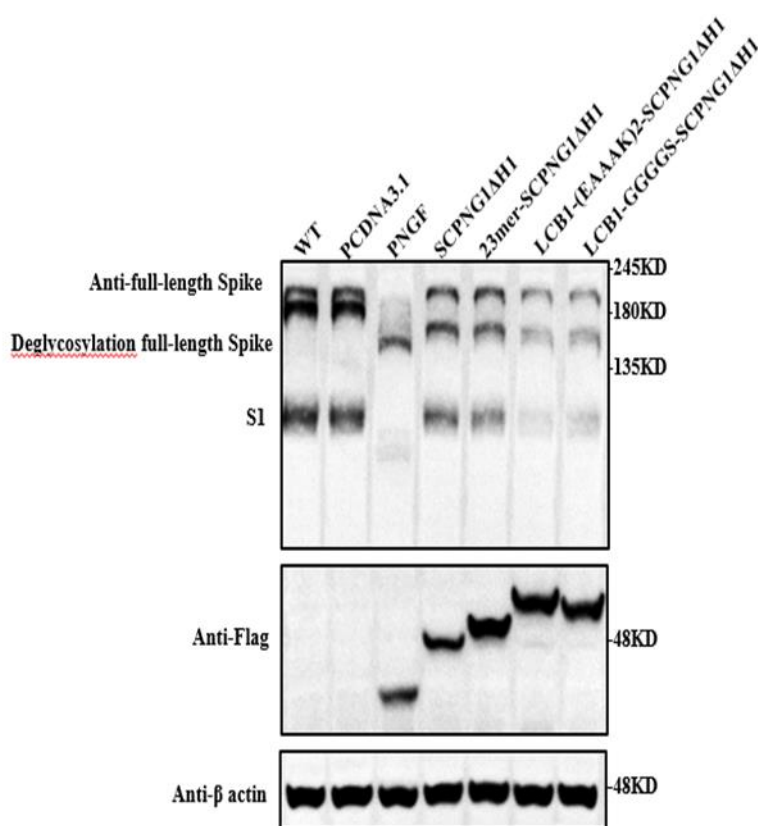


图 3.5 靶向编辑器对全长 S 蛋白的去糖基化效果

3.4.3 蛋白质免疫共沉淀结果

HEK - 293T - S - 682M 稳定细胞株，是将 S 蛋白的 S1 亚基与 S2 亚基之间的第 682 至 685 位裂解位点的 RRAR 氨基酸残基突变成 GGSG，导致 S1 与 S2 之间不能被 Furin 蛋白酶水解，从而能够获得完整的 S 全长蛋白。

蛋白-蛋白相互作用结果见图3.6，糖基化S蛋白条带约240 KDa，Input组中能观察到LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1（图中简称为LCB1 - ScPNG1 Δ H1）对全长S蛋白的去糖基化效果较好，在180 KDa左右能看见有明显的去糖基化条带。此外，表达量相对高的ScPNG1 Δ H1对全长S蛋白反而只有较弱的去糖基化效果，因此在180 KDa左右的条带较浅。

在IP组能观察到富集到的靶向编辑器LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1相比于ScPNG1 Δ H1更少，但是与LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1相互作用的全长S蛋白却更多。这说明LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1与S全长蛋白有更强的相互作用，主要是靶向肽LCB1增强了编辑器与S蛋白的相互作用。

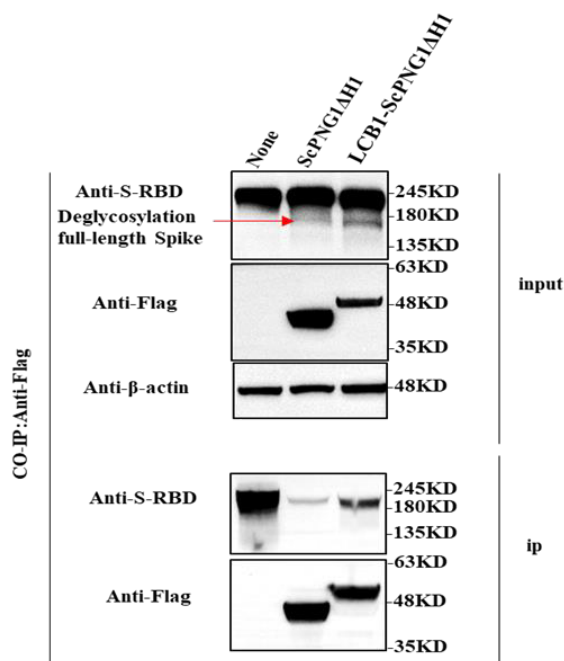


图 3.6 靶向编辑器和 S - 682M 蛋白相互作用结果
(LCB1 - ScPNG1 Δ H1 为 LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 的简称)

3.5 本章小结

本章完成了靶向编辑器去糖基化效果的验证，对靶向编辑器与底物S蛋白的蛋白-蛋白相互作用进行了探索。在表达S1蛋白和全长S蛋白的稳定细胞株中发现靶向编辑器LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1和LCB1 - (EAAAK)₂ - ScPNG1

$\Delta H1$ 有更好的去糖基化效果。对靶向编辑器 LCB1 - GGGGS - ScPNG1 $\Delta H1$ 进行了蛋白相互作用验证, 结果发现相比于 ScPNG1 $\Delta H1$, 靶向编辑器 LCB1 - GGGGS - ScPNG1 $\Delta H1$ 与 S 蛋白有强的相互作用, 佐证了靶向编辑器具有更好的去糖基化效果

第4章 靶向编辑器对假病毒组装、膜融合及侵染的影响

4.1 引言

S蛋白是存在新型冠状病毒表面高度糖基化的膜蛋白，新冠病毒通过S蛋白与宿主细胞表面的ACE2识别，随后启动膜融合过程将自身基因组RNA释放到宿主细胞内，以宿主细胞内核苷酸为原料合成更多的病毒颗粒，当大量病毒颗粒被释放到细胞外，则会造成细胞感染。第三章验证了靶向编辑器LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1无论是对新冠病毒S1蛋白还是全长S蛋白都有较明显的去糖基化编辑效果。为了验证靶向编辑器对病毒侵染的影响本章使用三质粒包装系统生成假病毒，并设计了假病毒侵染、膜融合等相关实验。

4.2 实验材料及仪器

4.2.1 实验材料

表 4.1 主要实验材料

试剂名称	试剂公司
PLVX - LUC	本实验室
S - WT - Δ 19	本实验室
293T - ACE2	本实验室
细胞培养基	全式金
胰蛋白酶	索莱宝
青 - 链霉素	索莱宝
嘌呤霉素	碧云天
潮霉素	碧云天

续表 4.1

试剂名称	试剂公司
病毒浓缩试剂盒	碧云天
萤火虫荧光素酶检测试剂盒	碧云天
试剂名称	试剂公司
0.22 μm 滤膜	塞恩斯仪仪器 北京博奥龙免疫技术
病毒滴度检测试剂盒	有限公司
1.5 mL 离心管	爱必胜生物科技

4.2.2 实验仪器

表 4.2 主要实验仪器

仪器名称	生产厂家
低温超速离心机	艾本德
水平脱色摇床	其林贝尔
多功能酶标仪	岛津
显影仪	赛力斯自动化科技

4.3 实验方法

4.3.1 假病毒包装

本文使用 psPAX2 质粒和 pLVX - LUC 质粒（包装慢病毒的质粒），实验组添加含有 S 蛋白基因的质粒 pcDNA3.1 - S - WT - ΔH19（将全长 S 蛋白后 19 位氨基酸切除，可提高转染效率），对照组是空载体质粒。

将三个质粒共转染到 293T 细胞中，包装成新型冠状病毒假病毒，形成的假病毒为空白对照组。实验组为在 psPAX2 质粒、pLVX - LUC 质粒以及含有 S 蛋白基因的质粒 pcDNA3.1 - S - WT - ΔH19 的基础上，在 293T 细胞中转染靶向编

辑器质粒 pcDNA3.1 - LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH, 所形成假病毒颗粒为实验组。转染之后的细胞培养 72 - 96 h, 期间不断补加无血清无抗生素的 DMEM 培养基保证细胞存活, 72 - 96 h 后小心收集细胞上清, 此时的病毒颗粒存在于细胞上清液中。

4.3.2 假病毒浓缩

① 离心: 将上一步收集的带有假病毒的细胞上清液转移到 250 mL 离心桶内, 将离心桶放置 4℃超速离心机中, 离心条件为: 4000 rpm, 60 min。离心后收集上清, 4℃保存。

② 过滤: 将收集的细胞上清液分批次过滤, 将上清最终浓缩至 500 μL - 1 mL

4.3.3 假病毒滴度测定

本实验采用假病毒滴度检测试剂盒对假病毒滴度进行检测, 其原理为双抗体夹心法测定 HIV - 1 P24 蛋白, 即将抗 HIV - 1 P24 的单克隆抗体包被于微孔板, 待测样品加入已包被的反应孔内孵育, 若标本中含有 HIV - 1 P24 蛋白, 则该蛋白与孔内的抗体形成抗原抗体复合物, 加入酶标抗 HIV - 1 P24 单抗, 孵育后, 酶标抗体与抗原抗体复合物上的抗原结合, 再与底物反应显色, 最后用硫酸终止反应, 用酶标仪测定 OD 值。检测步骤如下:

① 配液: 将 50 mL 浓缩洗涤液 (20×) 用蒸馏水稀释至 1000 mL;

② 定量 HIV - 1 P24 系列稀释: 阳性对照 (PC) 含有 320 pg/mL 的重组 HIV - 1 P24 抗原, 用阴性对照 (NC) 倍比系列稀释五个浓度的阳性对照。如果定量的是细胞培养上清液则用要用未被感染的细胞培养上清液进行系列稀释抗原。

③ 编号: 将样品对应孔按序编号, 每板设阴性对照 3 孔、阳性对照两孔、空白一孔, 如果测定样品为细胞培养上清液, 则需用未感染的细胞培养上清液做阴性对照 3 孔;

④ 每个孔加入 25 μL 裂解液;

⑤ 将 100 μL 待测样品或对照品加入到有裂解液的反应孔中，振荡 30 - 60 s 混匀，置 37°C 孵育 1 h；

⑥ 洗板 5 次，排干后每孔加入酶结合物 125 μL / 孔（空白孔不加），置 37°C 孵育 1 h；

⑦ 洗板 5 次，排干后每孔加入底物（底物：显色液 = 1 : 1 混合）125 μL / 孔。置 37°C 孵育 30 min，加入终止液 50 μL / 孔；

⑧ 用酶标仪读数，波长 450 nm

⑨ 标准曲线的绘制

⑩ 滴度计算：P24 蛋白是假病毒外壳中含量最大的标志性蛋白，一个假病毒颗粒中约有 2000 个 P24 蛋白分子，用以下公式可以计算病毒载体的颗粒数（LP）：

一个 LP 相当于： $2000 \times 24 \times 10^3 / (6 \times 10^{23}) \text{ g of P24} = 8 \times 10^{-5} \text{ pg of P24}$ ；
 $1 \text{ ng P24} = 1.25 \times 10^7 \text{ LPs}$ （约为 $1.25 \times 10^4 \text{ TU}$ ）

正常情况下，每 100 - 1000 LPs 中会有 1 个具有感染活性的病毒载体，即 1 TU。

注意：上述公式计算得到的 LP 值是理论值，样品中可能含有的游离 P24 蛋白可能会使该值偏高。通常上清中病毒含量需要超过 10^6 TU / mL ，才能确保浓缩纯化的得到足够浓度的病毒载体。

4.3.4 假病毒侵染

将浓缩的病毒滴度测定后，按照实验组与对照组相同滴度对 HEK - 293T - ACE2 进行侵染。

① 细胞铺板：将 HEK - 293T - ACE2 细胞铺到 24 孔板中，大约每孔细胞为 1.5×10^5 个，37°C 培养过夜；

② 侵染：将计算好的同一滴度的病毒加入到 24 孔板中，每种病毒侵染设置三个复孔，将病毒与 HEK - 293T - ACE2 细胞 37°C 共同孵育 6 h - 8 h，6 h - 8 h 后小心吸弃病毒溶液，并补加完全培养基继续培养细胞 48 h - 72 h。

③ 48 h - 72 h 后将细胞裂解，用萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒检测每孔的荧光值，可以间接反应病毒的侵染效率。

4.3.5 膜融合

细胞膜融合的检测试剂盒利用的是酵母双杂交原理：萤火虫荧光素酶（firefly luciferase）是一种分子量约为 61KDa 的蛋白，在 ATP、镁离子和氧气存在的条件下，可以催化 luciferin 氧化成 oxyluciferin，在 luciferin 氧化的过程中，会发出波长为 560 nm 左右的生物荧光。生物荧光可以通过化学发光仪进行测定。通过荧光素和荧光素酶这一生物发光体系，可以非常灵敏、高效地检测基因的表达。通常把感兴趣基因的转录调控元件或 5'启动子区克隆在 luciferase 的下游等，构建成报告基因质粒。随后对细胞进行转染，转染 48 h 左右用适当药物处理细胞后裂解细胞，测定荧光素酶活性。通过荧光素酶活性的高低来判断药物等处理对目的基因的转录调控作用。

① 细胞培养：将本实验室 HEK - 293T - S 稳定细胞株和 HEK - 293T - ACE2 稳定细胞株进行培养，待细胞稳定后将 HEK - 293T - S 细胞铺至六孔板培养，将 HEK - 293T - ACE2 细胞放置 10 cm 平皿培养，第二天对两种细胞进行转染。

② 转染：准备以下质粒：pFR - luc，pBD - NF - Kb，pcDNA3.1 - ScPNG1ΔH1，pcDNA3.1 - LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1，pcDNA3.1 - LCB1 - (EAAAK)₂ - ScPNG1ΔH1。并按照表 4.3 对 HEK - 293T - S 进行转染。并在 HEK - 293T - ACE2 中转染 pFR - luc。

表 4.3 膜融合转染参照表

编号	质粒名称
①	None + No pFR - luc（阴性对照）
②	None + pFR - luc（阳性对照）
③	pcDNA3.1 - ScPNG1ΔH1 + pFR - luc
④	pcDNA3.1 - LCB1 - (EAAAK) ₂ - ScPNG1ΔH1 + pFR - luc

续表 4.3

编号	质粒名称
⑤	pcDNA3.1 - LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1 + pFR - luc

③ 细胞融合：将 HEK - 293T - ACE2 细胞从 10 cm 平皿中消化下来后，1000 rpm 离心 3 - 5 min，离心后用 PBS 重悬洗涤细胞细胞，1000 rpm 离心 2 min，此操作重复两次，随后将 HEK - 293T - ACE2 细胞转移到已经提前铺好含有 HEK - 293T - S 细胞的 24 孔细胞培养板中，然后用含有 TPCK - trypsin 的完全培养基对两种细胞进行 37℃培养，约 24 h 后吸弃 24 孔板细胞上清液，用萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒对两种细胞的融合状况进行检测。

④ 荧光素酶的检测：

- 取出细胞培养板在室温平衡 10 min。
- 96 孔板每孔加入 100 μL 的 Bright - Lumi™ 萤火虫荧光素酶检测试剂。
- 室温约 25℃孵育 5 min。使发光信号趋于稳定。
- 使用具有检测化学发光功能的多功能酶标仪进行化学发光检测。

4.3.6 线粒体膜电位检测

线粒体膜电位检测是以 TMRE 为荧光探针，快速灵敏地检测细胞、组织或纯化的线粒体膜电位变化的检测方法。TMRE（tetramethylrhodamine, ethyl ester），中文名称叫做四甲基罗丹明乙酯，是一种可渗透细胞膜的橘红色阳离子荧光探针，可在完整的线粒体中聚集，而去极化或非活跃性线粒体膜电位降低，导致 TMRE 积聚减少。检测时 TMRE 的最大激发波长为 550 nm，最大发射波长为 575 nm。

① 细胞培养：培养 HEK - 293T - S 稳定细胞株，此细胞株可以稳定表达 Spike 蛋白，用此细胞株表征被病毒感染的细胞。

② 转染：分别向 HEK - 293T - S 的稳定细胞株中转染空载体质粒，非靶向编辑器质粒 pcDNA3.1 - ScPNG1ΔH1，靶向编辑器质粒 pcDNA3.1 - LCB1 -

GGGS - ScPNG1ΔH1, 和 pcDNA3.1 - LCB1 - (EAAAK)₂ - ScPNG1ΔH1, 转染后 48 h 收集细胞。

③ 细胞计数: 取适量细胞 600×g 室温离心 5 min, 弃上清, 加入适当体积 TMRE 染色工作液重悬细胞, 使细胞密度约为 $1 \times 10^6 / \text{mL}$ 。

④ 孵育: 细胞培养箱中 37℃ 孵育 30 min。37℃ 孵育结束后, 600×g 室温离心 5 min, 沉淀细胞。吸除上清, 注意尽量不要触及细胞。

⑤ 洗涤: 用 37℃ 预热的细胞培养液洗涤 2 次。加入 1 mL 37℃ 预热的细胞培养液重悬细胞, 600×g 离心 5 min, 沉淀细胞, 弃上清。再加入 1 mL 37℃ 预热的细胞培养液重悬细胞, 600×g 离心 5 min, 沉淀细胞, 弃上清。

⑥ 检测: 用适量细胞培养液重悬后, 用荧光酶标仪分析。

4.4 实验结果及讨论

4.4.1 假病毒滴度测定结果

此实验通过 ELISA 方法可以特异性检测 P24 衣壳蛋白质, 通过与 P24 标准品制作的标准曲线相比较, 就可以获得检测样品的病毒滴度。测定后所绘制的标准曲线方程为: $y = 31.988x - 13.808$, 方程的 $R^2 = 0.9963$, 置信度较高, 因此使用此标准方程计算假病毒滴度。

表 4.4 标准品 P24 吸光度值

OD 值 (562 nm)	浓 度 (mg / mL)
0.62	5
0.759	10
1.075	20
1.58	40
2.97	80

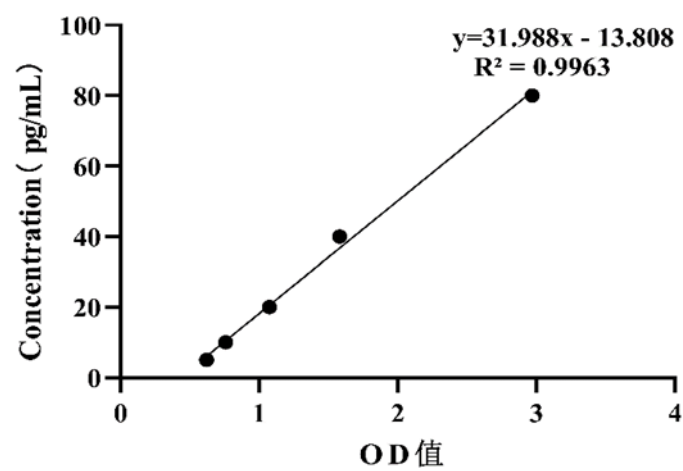


图 4.1 假病毒 P24 标准曲线

表 4.5 假病毒滴度测定结果

假病毒名称	OD 值	假病毒浓度 (pg / mL)	假病毒滴度 (TU / mL)
Vector	3.633	10240.73	1.28×10 ⁶
ScPNG1ΔH1	3.293	9153.11	1.25×10 ⁶
LCB1 - ScPNG1ΔH1	3.557	9996.02	1.07×10 ⁶

假病毒滴度测定结果显示：分别转入两种靶向编辑器的假病毒的病毒滴度相比于转入空载体的病毒滴度低，说明编辑器可以抑制假病毒颗粒的形成。对比转入 ScPNG1ΔH1 编辑器和转入 LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1 编辑器的假病毒滴度，发现转入 LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1 编辑器的假病毒滴度更低，说明靶向编辑器对于病毒的形成有更强的抑制效果。后续将病毒滴度统一为 1.0×10⁶ TU，再对 HEK - 293T - ACE2 细胞进行侵染。

4.4.2 假病毒侵染结果

将包装好的假病毒按照同一滴度侵染 HEK - 293T - ACE2 细胞、Calu - 3 细胞以及 PC - 9 细胞，侵染后用萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒对病毒的侵染能力进行检测，最后对检测到的信号进行归一化处理，结果见图 4.2。

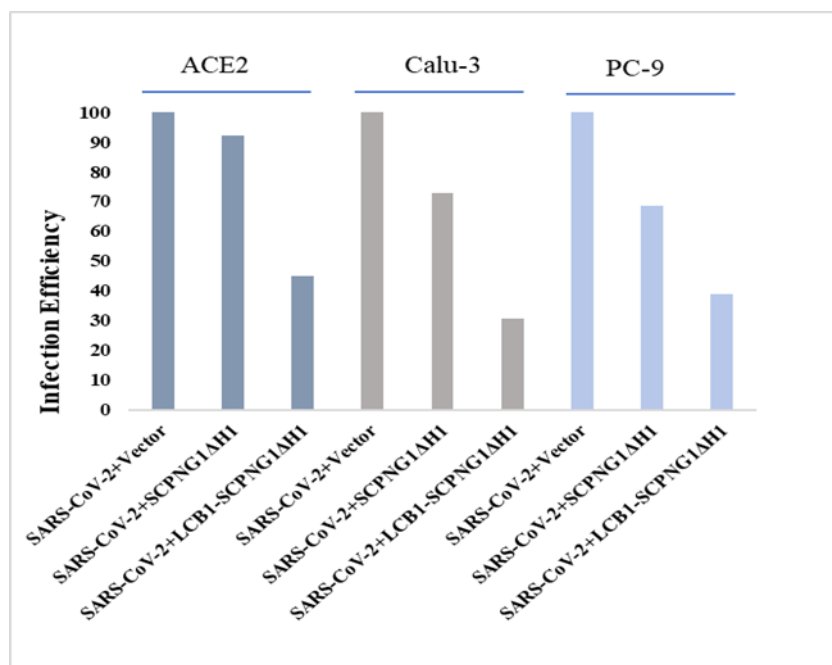


图 4.2 假病毒侵染三种细胞效率结果

转入编辑器的阳性实验组的假病毒侵染效率都比空白对照组低，其中，转入 LCB1 - GGGGS - SCPNG1 Δ H1 靶向编辑器后病毒的侵染效率最低，转入 SCPNG1 Δ H1 编辑器的病毒侵染效率居中。实验结果表明。靶向编辑器对病毒侵染都有不同程度的抑制。其中，经 ScPNG1 Δ H1 编辑器处理后，病毒对 ACE2 细胞侵染的效率下降了 10% 左右，对 Calu - 3 细胞和 PC - 9 细胞侵染的效率下降了 30% 左右；转入靶向编辑器 LCB1 - GGGGS - SCPNG1 Δ H1 后，病毒对 ACE2 细胞和 PC - 9 细胞侵染的效率下降了 60% 左右，病毒对 Calu - 3 细胞的侵染效率下降了约 70%。以上结果表明，带有靶向肽的编辑器对于病毒侵染有较强的抑制效果。

新冠病毒 S 蛋白是存在于病毒表面的糖基化膜蛋白，其在病毒入侵过程中发挥着重要的作用。病毒 S 蛋白与细胞膜表面 ACE2 受体的识别，以及组织蛋

白酶L对S2'的切割释放的融合肽，激活融合孔的形成是介导病毒基因组进入宿主细胞的关键过程，而糖基化的S蛋白是维持其自身构象以及与ACE2识别的前提条件。靶向去糖基化编辑器可以通过LCB1靶向S蛋白的受体结合结构域附近从而对S蛋白进行去糖基化编辑，这种编辑会导致S蛋白的构象发生变化，削弱其与细胞表面ACE2的识别和结合能力，影响后续的蛋白酶TMPRSS2切割以及融合孔的形成，从而抑制病毒入侵宿主细胞。

4.4.3 膜融合结果

酵母双杂交检测系统所发出的荧光信号值间接反应HEK-293T-S与HEK-293T-ACE2两细胞的融合效率，融合率高则荧光信号强。其结果如下：

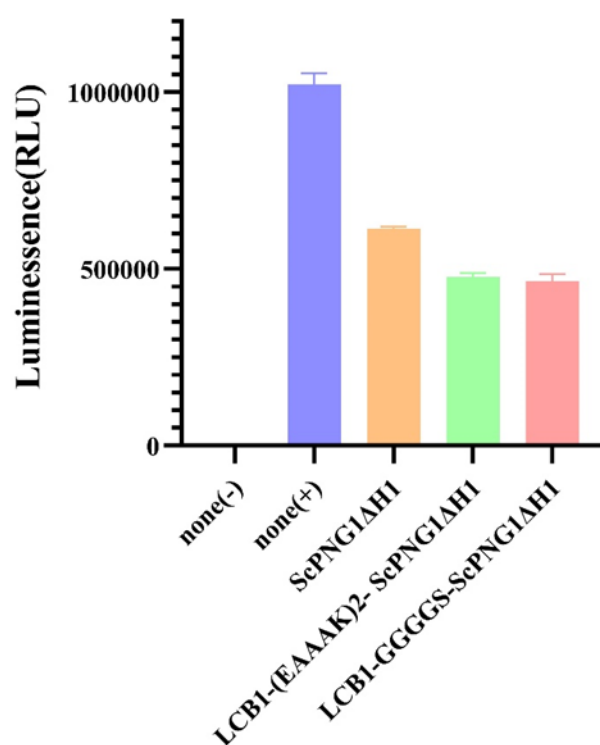


图 4.3 S 蛋白与 ACE2 细胞融合结果

膜融合实验结果显示将ScPNG1ΔH1、LCB1-GGGGS-ScPNG1ΔH1、LCB1-(EAAAK)₂-ScPNG1ΔH1分别转染HEK-293T-S细胞之后，膜融合后的荧光信号强度都有不同程度的减弱，其中转入靶向编辑器LCB1-GGGGS-

ScPNG1 Δ H1 和 LCB1 - (EAAAK)₂ - ScPNG1 Δ H1 组的荧光信号值最低。

以上结果表明, 转染三种编辑器对于两种细胞的融合都有抑制效果, 但是转染靶向编辑器 LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 和 LCB1 - (EAAAK)₂ - ScPNG1 Δ H1 后对两种细胞融合抑制程度最大, 这也表明靶向编辑器在抑制两种细胞融合过程中发挥了重要的作用。

正常情况下新型冠状病毒 S 蛋白的 RBD 结构域首先与宿主细胞膜表面 ACE2 受体识别并结合, 当新冠病毒的 S 蛋白的 RBD 结构域与 ACE2 接触后会被 TMPRS2 蛋白酶切割, 使 S 蛋白上的 S2' 位点以及一些疏水性的氨基酸暴露, 这些暴露的氨基酸会迅速插入到宿主细胞膜的表面, 从而拉近病毒与宿主细胞的距离。而被切割后暴露的 S2' 构象迅速转变, 形成了一种融合前稳定构象, 促进后续的膜融合过程。

存在新冠病毒 S 蛋白 RBD 结构域中的 N - 糖链可以稳定维持 S 蛋白的构象以及介导 S 蛋白和 ACE2 的识别。当转入 ScPNG1 Δ H1 编辑器后, 由于 ScPNG1 Δ H1 能够直接识别和催化底物 S 蛋白的去糖基化所以可以强化编辑器的编辑效率, 对 S 蛋白和 ACE2 的识别过程有更大的抑制程度, 因此对膜融合和最终假病毒侵染的抑制效果最佳。

4.4.4 线粒体膜电位检测结果

本实验 WT (Wild Type) 为空白对照组, 不转染任何质粒, Vector 表示转染空载体, Vector - 0.5, Vector - 1, Vector - 2 表示空载体的转染量分别为 0.5 μ g、1 μ g 和 2 μ g, 后续的靶向编辑器同样按照此方式进行转染, 得到的线粒体膜电位检测结果见图 4.4。编辑器质粒由 0.5 μ g 增加到 2 μ g, 线粒体膜电位逐渐降低; 相比于 WT 组, 0.5 μ g 的 ScPNG1 - Δ H1 和 LCB1 - (EAAAK)₂ - Scpng1 Δ H1 编辑器质粒会使线粒体的膜电位明显增加, 而 LCB1 - GGGGS - ScPNG1 - Δ H1 编辑器质粒 0.5 μ g 会使线粒体的膜电位相比于 WT 组降低。

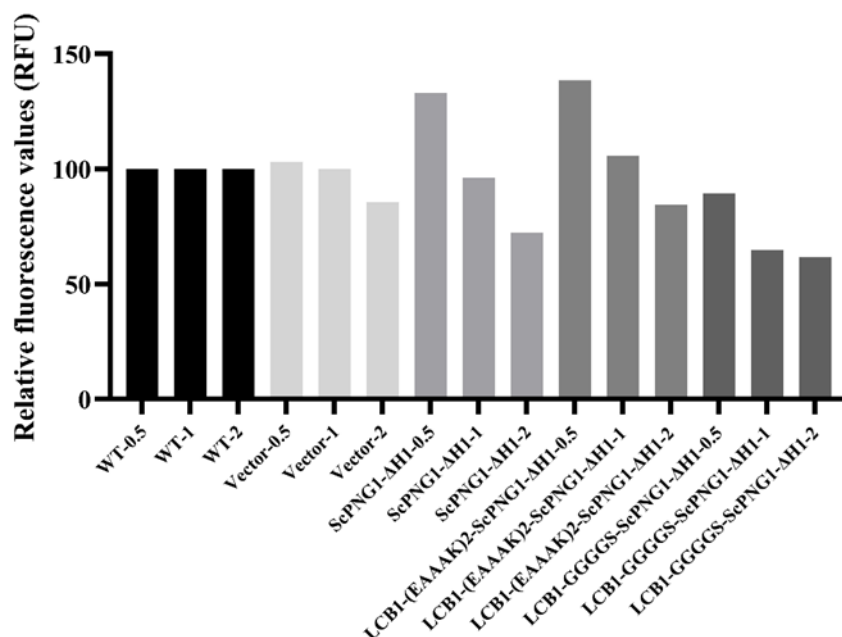


图 4.4 靶向编辑器对线粒体膜电位影响结果

许多资料显示,当细胞处于应激条件下,线粒体会过度增殖。当编辑器质粒由 0.5 μg 增加到 2 μg 后,编辑器质粒对细胞的损害逐渐增强,导致细胞中线粒体通透性增大,膜电位降低;0.5 μg 的 pcDNA3.1 - LCB1 - (EAAAK)₂ - ScPNG1 Δ H1 编辑器质粒会使线粒体的膜电位相比于 WT 组明显增加,而 pcDNA3.1 - LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 编辑器质粒 0.5 μg 会使线粒体的膜电位相比于 ScPNG1 Δ H1 组降低,主要原因为 ScPNG1 Δ H1 编辑器可能使线粒体过度增殖导致线粒体数量整体变多从而使膜电位的总和增大,而 LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 编辑器由于其带有柔性 Linker,能更灵活的靶向 S 蛋白的 RBD 结构域,所以对表达全长 S 蛋白的细胞损伤较大,导致细胞发生凋亡,活细胞数量变少,导致线粒体膜电位直接变低。

在表达全长 S 蛋白的细胞中转入编辑器发现 2 μg 的 LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 编辑器对于线粒体的膜电位有最大的影响,说明使用 2 μg 靶向编辑器使细胞的线粒体膜电位丢失,造成细胞损伤。这一结果可能揭示了本文靶向编辑器抵抗病毒感染细胞的另一种机制:靶向编辑器 LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 通过损坏受感染细胞的线粒体,使线粒体膜电位丢失导致被感染细

胞死亡，从而降低病毒再感染的机率。

4.5 本章小结

本章完成了假病毒包装、滴度测定、病毒侵染、膜融合以及线粒体膜电位检测等实验，在病毒滴度测定实验结果中发现转入靶向编辑器的实验组假病毒滴度明显降低，猜测靶向编辑器通过对 S 蛋白 RBD 结构域进行去糖基化编辑一定程度上抑制了假病毒的包装，降低分泌到胞外的假病毒颗粒数。假病毒侵染实验和膜融合实验结果显示细胞转入靶向编辑器后假病毒颗粒数降低，原因是靶向编辑器对 S 蛋白去糖基化后导致其与 ACE2 受体融合能力变差，由 S 蛋白介导的假病毒侵染效率也变差。线粒体膜电位检测结果显示靶向编辑器 LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 可以通过损坏受感染细胞的线粒体，使细胞线粒体膜电位丢失，导致被感染细胞死亡，降低病毒再感染的机率。综上所述，本章明确了靶向编辑器在抑制病毒感染方面的有效性，并且还揭示了靶向编辑器抑制病毒感染的另一种作用机制。

第5章 靶向编辑器对新型冠状病毒S蛋白稳定性的影响

5.1 引言

新型冠状病毒S蛋白上的N-糖链在许多方面都发挥着重要作用,比如调控蛋白质稳定性、病毒的趋向性和保护潜在的抗原表位免受免疫监视等^[43]。前文发现转入靶向编辑器后,细胞中S蛋白量明显减少,为解释这一现象本章进行了S蛋白半衰期以及降解的相关验证。为评估靶向编辑器安全性本文进行了细胞活性实验。

放线菌酮(CHX)是一种蛋白质合成抑制剂,通过结合到80S核糖体上阻止翻译过程tRNA的易位抑制蛋白质的合成。

MG132是源自中药材的天然三萜蛋白酶体抑制剂,能抑制不同类型蛋白酶活性,通过与 β 亚基的活性位点共价结合来抑制20S蛋白酶体活性,并有效阻断26S蛋白酶体复合物的蛋白水解活性。

NH₄Cl是溶酶体抑制剂,主要抑制溶酶体对自噬小体的降解。

5.2 实验材料及仪器

5.2.1 实验材料

表 5.1 主要实验材料

试剂名称	试剂公司
HEK - 293T - S1 稳定细胞株	本实验室
蛋白酶体抑制剂 MG132	碧云天
自噬溶酶体抑制剂 NH ₄ CL	碧云天
放线菌酮 CHX	碧云天
嘌呤霉素	碧云天

续表 5.1

试剂名称	试剂公司
青 - 链霉素	索莱宝
细胞培养基	全式金
胰蛋白酶	索莱宝
1×PBS	索莱宝

5.2.2 实验仪器

表 5.2 主要实验仪器

仪器名称	生产厂家
低温超速离心机	艾本德
水平脱色摇床	其林贝尔
多功能酶标仪	岛津
显影仪	赛力斯自动化科技

5.3 实验方法

5.3.1 质粒转染

准备 HEK - 293T - S1 稳定细胞株，待稳定后将细胞铺至六孔板。转染空载体质粒 Vector，编辑器质粒 pcDNA3.1 - ScPNG1ΔH1，pcDNA3.1 - LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1 各 2 μg，此外还需设置完全空白对照组。具体转染方法见第三章实验方法（3.3.1）。

5.3.2 细胞加药处理

（1） 靶向编辑器对 S 蛋白半衰期影响实验

转染 48 h 后，将 MG132（蛋白酶体抑制剂）粉末配置成 5μg / μL，将

NH₄CL（自噬溶酶体抑制剂）粉末配置成0.2mg/μL随后每孔加10μL的MG132，每孔加20μL的NH₄CL，处理细胞12h后收集细胞提取总蛋白。

（2） 靶向编辑器对S蛋白降解影响实验

转染48h后，将称量好的放线菌酮（CHX）粉末溶解在二甲基亚砜（DMSO）中，配置成50mM的溶液。每1mL细胞培养基加2mL CHX对细胞进行处理，并分别提取药物处理0h，4h，8h，12h后的细胞总蛋白。

5.3.3 总蛋白提取

将细胞培养基吸弃，用预冷的PBS洗涤细胞两次，吸弃废液，随后每孔加入200μL的高效RIPA裂解液（按照高效RIPA裂解液：PMSF = 100：1进行配制）具体方法见第三章实验方法（3.3.2）。

5.3.4 BCA 蛋白浓度测定

① 首先使用标准品绘制蛋白标准曲线，横坐标代表吸光度值，纵坐标代表蛋白浓度。

② 将其他蛋白样品的吸光度值带入到标准曲线中，计算出蛋白浓度。具体实验方法见第三章实验方法（3.3.3）。

5.3.5 蛋白样品制备

蛋白样品制备具体实验方法见第三章实验方法（3.3.4）

5.3.6 蛋白质免疫印迹实验

蛋白质免疫印迹实验具体实验方法见第三章实验方法（3.3.5）。

5.3.7 细胞活性检测

① 细胞培养：将HEK-293T细胞培养到第三代。

② 细胞传代：吸除培养基，用1×PBS清洗一次（3-5mL），吸除PBS，

加入 600 μL 胰酶, 消化 2 - 5 min, 加入完全培养基停止消化, 300 g, 离心 5 min, 弃去培养基, 加入 1 mL 1xPBS 重悬, 然后取此体系的细胞 10 μL 到 90 μL 1 $\times$ PBS 中, 将细胞稀释 10 倍, 随后进行细胞计数, 保证 6 孔板中每孔细胞数量在 60 万左右。

③ 细胞转染: 2 μg ScPNG1 Δ H1、LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 以及空载体质粒分别转染到 HEK - 293T 细胞中, 培养 48 h。48 h 后每孔加 200 μL 胰蛋白酶进行细胞消化。将消化下来的细胞取 200 μL 至 1.5 mL 微量离心管中。

④ 细胞计数: 将上一步收集到的细胞离心 300 g, 5 min, 弃培养基, 加入 1 mL 1 $\times$ PBS 重悬, 随后进行细胞计数, 各取 40000 个细胞 (用新鲜培养基补足到 100 μL 体积) 到白色 96 孔板中, 每组设置 3 个平行孔, 加入平衡到室温的 CellTiter - Glo 试剂每孔各 100 μL , 放在摇床上温和混匀 2 min, 室温孵育 10 min, 最后使用多功能酶标仪对每孔荧光值进行检测。

5.4 实验结果及讨论

5.4.1 BCA 蛋白浓度测定结果

BCA 法测定蛋白质浓度后所绘制的标准曲线方程为: $y = 1.093x - 0.1174$, 方程的 $R^2 = 0.9993$, 置信度较高。因此使用此方程计算蛋白样品浓度。

表 5.3 BCA 蛋白标准品浓度

OD 值 (562 nm)	浓 度 (mg / mL)
0.088	0.025
0.110	0.125
0.224	0.250
0.364	0.500
0.583	0.750

续表 5.3

OD 值 (562 nm)	浓 度 (mg / mL)
0.786	1.000
1.037	1.500
1.470	2.000

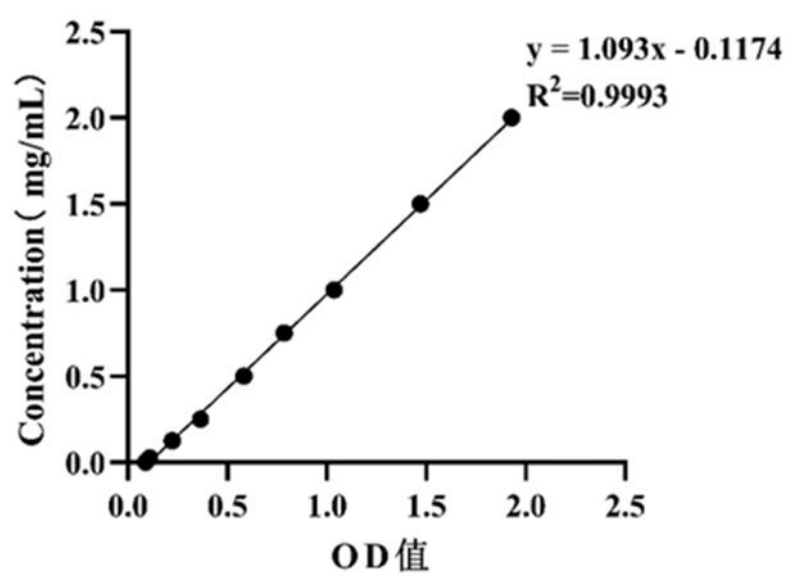


图 5.1 BCA 蛋白标准曲线

(1) 靶向编辑器对 S / S1 蛋白半衰期影响实验

表 5.4 全长 S 蛋白半衰期实验蛋白浓度

名称	OD 值	蛋白浓度
Vector - 0 h	0.835	0.80
Vector - 4 h	0.769	0.72
Vector - 8 h	0.753	0.71
Vector - 12 h	0.885	0.85

续表 5.4

名称	OD 值	蛋白浓度
ScPNG1ΔH1 - 0 h	0.895	0.86
ScPNG1ΔH1 - 4 h	0.879	0.84
ScPNG1ΔH1 - 8 h	0.856	0.82
ScPNG1ΔH1 - 12 h	0.820	0.78
LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1 - 0 h	0.759	0.71
LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1 - 4 h	0.873	0.84
LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1 - 8 h	0.851	0.81
LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1 - 12 h	0.853	0.81

表 5.5 S1 蛋白半衰期实验蛋白浓度

名称	OD 值	蛋白浓度
Vector - 0 h	1.223	1.22
Vector - 4 h	1.180	1.17
Vector - 8 h	1.165	1.16
Vector - 12 h	1.186	1.18
ScPNG1ΔH1 - 0 h	1.186	1.18
ScPNG1ΔH1 - 4 h	1.175	1.17
ScPNG1ΔH1 - 8 h	1.274	1.28
ScPNG1ΔH1 - 12 h	1.221	1.22
LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1 - 0 h	1.137	1.13
LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1 - 4 h	1.103	1.09
LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1 - 8 h	1.118	1.11

续表 5.5

名称	OD 值	蛋白浓度
LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1 - 12 h	1.181	1.17

(2) 靶向编辑器对 S1 蛋白降解影响实验

表 5.6 S1 蛋白降解实验蛋白浓度

名称	OD 值	蛋白浓度
Vector	0.640	0.58
ScPNG1ΔH1	0.784	0.74
ScPNG1ΔH1+MG132	0.526	0.46
ScPNG1ΔH1+NH ₄ CL	0.460	0.39
LCB1 - ScPNG1ΔH1	0.706	0.65
LCB1 - ScPNG1ΔH1+MG132	0.459	0.38
LCB1 - ScPNG1ΔH1+NH ₄ CL	0.408	0.33

5.4.2 靶向编辑器对 S 蛋白稳定性影响

(1) 靶向编辑器对全长 S 蛋白 / S1 蛋白半衰期影响

靶向编辑器对全长 S 蛋白半衰期的影响：S 全长蛋白稳定性实验的蛋白印迹结果如图 5.2 所示，为了更加直观的显示编辑器使用后蛋白质半衰期缩短，我们使用 Image J 软件对蛋白质印迹图进行灰度分析，得到下图的折线统计图。

实验结果显示编辑器的加入会加快 S 蛋白的降解速率，图中可以直观看到加入编辑器的 S 蛋白降解曲线斜率更大，其中靶向编辑器的加入可以大大缩短 S 蛋白的半衰期，使 S 蛋白的半衰期从 9 h 左右缩短至 7 h 左右。说明靶向编辑器去除 S 蛋白的 N - 糖链之后会造成 S 蛋白不稳定，更容易被降解。

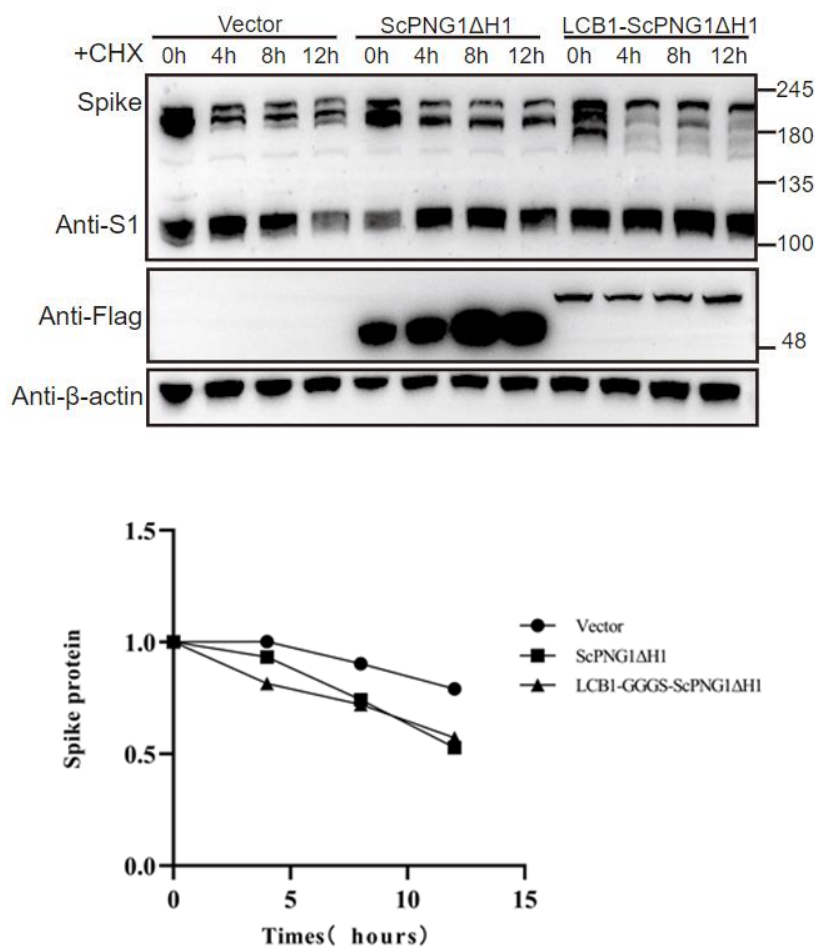


图 5.2 全长新冠病毒 S 蛋白半衰期的蛋白印迹

靶向编辑器对 S1 蛋白半衰期的影响：S1 蛋白稳定性实验的蛋白印迹结果如图 5.3 所示，为了更加直观的显示编辑器缩短蛋白质半衰期，我们使用 Image J 软件对蛋白质印迹图进行灰度分析，得到下图的折线统计图。

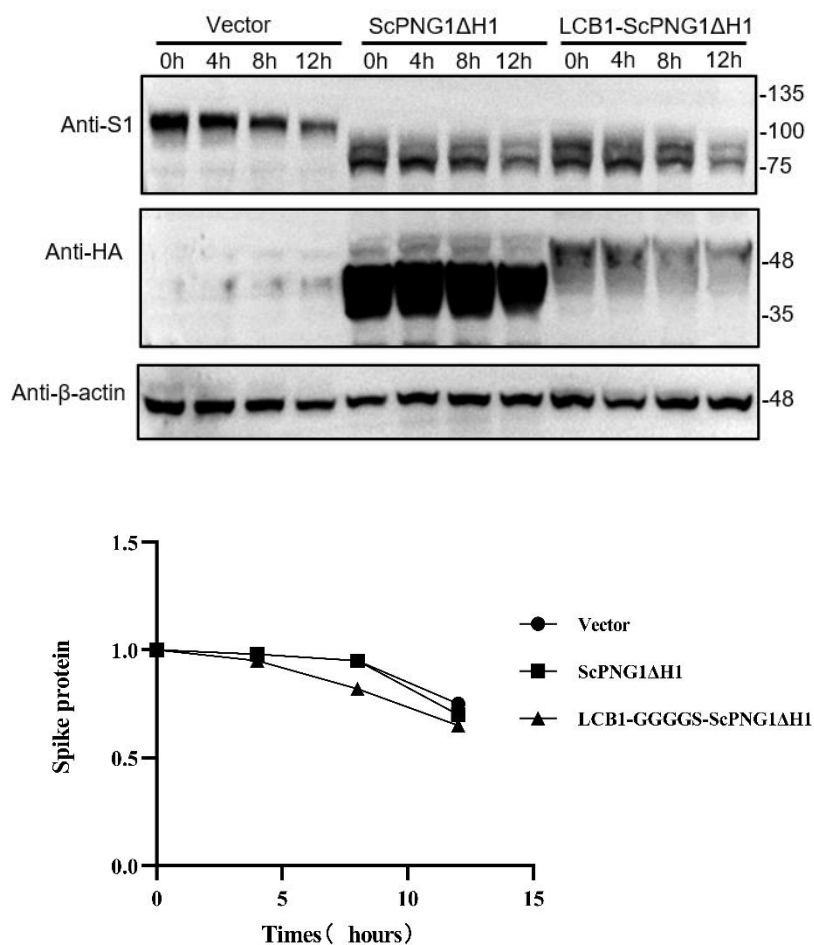


图 5.3 新冠病毒 S1 蛋白半衰期的蛋白印迹

转入编辑器后 S1 蛋白的稳定性明显变差, 即便 HEK - 293T - S1 细胞转入空载体后 S1 的蛋白也会发生降解, 但是从灰度分析结果上看转入空载体时 S1 的降解速率要比转入靶向编辑器的降解速率慢。转入非靶向编辑器时 S1 蛋白的半衰期大概在 10 h 左右, 而转入靶向编辑器的 S1 蛋白半衰期大概在 7 h 左右。因此, 靶向编辑器的转入使去糖基化 S1 蛋白的半衰期缩短, 导致 S1 蛋白不稳定。

通过以上数据发现相比于全长 S 蛋白, S1 蛋白的免疫共沉淀结果图更加清晰和直观, 因此蛋白质降解实验使用 HEK - 293T - S1 细胞系进行验证。

(2) 靶向编辑器对 S1 蛋白降解的影响

去糖基化 S1 蛋白的稳定性降低, 为了检测 S1 蛋白的降解途径, 使用 MG132 抑制细胞蛋白酶体功能, 使用 NH_4Cl 抑制细胞溶酶体功能, 蛋白质免疫印迹结果见图 5.4。

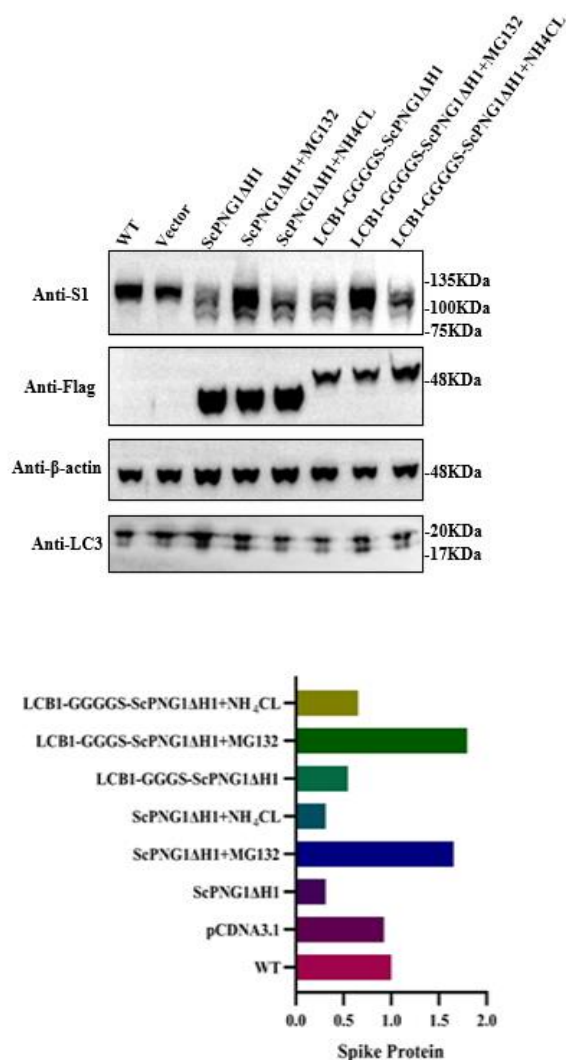


图 5.4 新冠病毒 S1 去糖基化后降解途径的蛋白印迹

在转入 ScPNG1ΔH1 / LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1 后, S1 蛋白分子量变小且蛋白印迹也明显变浅, 表明去糖基化后 S1 蛋白量变少。当使用蛋白酶体抑制剂 MG132 处理后, 去糖基化形式 S1 的蛋白量明显回补, 应用 Image J 量化后发现使用自噬溶酶体抑制剂时较少部分 S1 蛋白被回补。以上数据表明, 去糖基化后 S1 蛋白主要通过蛋白酶体途径降解, 较少部分经过自噬溶酶体途径降解。

5.4.3 细胞活性检测结果

CellTiter - Glo 是通过定量 ATP（它是新陈代谢活跃细胞存在的信号），测定培养物中活细胞数量的均质方法。此方法适用于多孔板模式，是自动化高通量筛选（HTS）、细胞增殖和细胞毒性检测的理想选择。ATP 量与培养物中细胞数量成正比，其依靠专有热稳定萤光素酶的特性，可产生稳定“辉光型”发光信号且可改善在各种检测条件下的性能。

使用 CellTiter - Glo 试剂盒对 HEK - 293T 细胞进行细胞活性检测，检测结果见图 5.5。

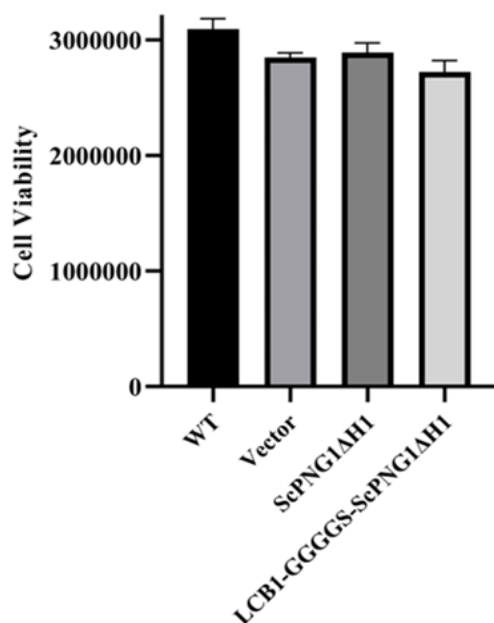


图 5.5 靶向编辑器对 HEK - 293T 细胞活性的影响结果

结果显示编辑器的转入对于细胞但是相比于非靶向编辑器 ScPNG1 Δ H1，靶向编辑器 LCB1 - GGGGS - ScPNG1 Δ H1 的转入可以使细胞活力轻微降低。本文所构建的靶向编辑器对哺乳动物 HEK - 293T 细胞并不会造成明显的损伤。综上所述，本文所构建的靶向编辑器具有相对较低的细胞毒性，可以作为抑制新型冠状病毒侵染的工具。

5.5 本章小结

本章主要研究了靶向编辑器对全长S蛋白/S1蛋白半衰期的影响、对S1蛋白降解途径的影响及对细胞活性的影响。结果显示靶向编辑器的转入会缩短全长S蛋白和S1蛋白的半衰期，导致蛋白质不稳定更容易降解。通过药物抑制剂抑制细胞蛋白酶体和自噬溶酶体功能发现蛋白酶体功能缺陷的细胞中S1蛋白有明显累积，这说明去糖基化编辑使S1蛋白主要经蛋白酶体途径降解。细胞活性检测显示靶向编辑器对哺乳动物细胞HEK-293T活性影响相对较低，可以作为抑制新型冠状病毒侵染的工具。因此，本文所构建的蛋白质靶向编辑器对于新型冠状病毒S蛋白不仅具有靶向去糖基化效果，还具有促进S蛋白降解的效果，说明LCB1-GGGGS-ScPNG1ΔH1既是一种新型的蛋白质靶向编辑器又是一种高效的蛋白质靶向降解器。

第6章 结论与展望

6.1 结论

本实验室前期已证明脑膜炎脓毒黄杆菌来源去糖基化酶 PNGase F 对新型冠状病毒包装和侵染有明显抑制作用，为了开发抑制新型冠状病毒侵染的新手段，本文以酿酒酵母来源的去糖基化酶为基础，设计了对新型冠状病毒 S 蛋白有较高亲和力的靶向肽以及刚性、柔性连接子，组装成一个具有靶向性的蛋白质编辑器，并对靶向编辑器进行去糖基化效果评估、假病毒组装、侵染评估、蛋白质稳定性评估。

本文三种靶向新冠病毒 S 蛋白去糖基化编辑器中，LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1 和 LCB1 - (EAAAK)₂ - ScPNG1ΔH1 有更好的去糖基化活性，对全长 S 蛋白和 S1 蛋白都表现出显著的去糖基化效果。

假病毒组装和侵染实验结果显示，编辑器的转入会降低假病毒组装效率直接导致假病毒侵染效率降低，靶向编辑器 LCB1 - GGGGS - ScPNG1ΔH1 和 LCB1 - (EAAAK)₂ - ScPNG1ΔH1 可使病毒侵染效率降低约 60% - 70%，而非靶向编辑器 ScPNG1ΔH1 仅能使病毒侵染效率降低约 10% - 30%。在假病毒膜融合实验结果中还发现靶向编辑器可使假病毒膜融合能力下降 50% 左右。

细胞活性结果显示靶向编辑器对于正常宿主细胞活力的影响相对较小，具有较低细胞毒性，表明靶向编辑器不会对内源性蛋白质造成影响，蛋白质稳定性实验表明靶向编辑器显著缩短 S1 蛋白半衰期，使 S1 蛋白半衰期从 10 h 缩短至 8 h，并且还促进了 S1 蛋白通过蛋白酶体途径降解。

总体而言，我们首次验证了酿酒酵母来源的经过截短改造的 ScPNG1ΔH1 在哺乳动物细胞中具有去糖基化酶活性，并且通过融合高亲和力的 LCB1 靶向肽，对底物新冠 S 蛋白造成了更深度的去糖基化编辑，使其变得极其不稳定，加速了其在细胞内的降解过程，最终对细胞融合和假病毒包装和侵染都造成了显著抑制。

6.2 展望

本文验证了所构建的靶向编辑器对于病毒包装、侵染、融合等方面的影响，展现出靶向编辑器抑制病毒侵染的有效性，但是限于时间和精力，靶向编辑器还有待更进一步优化与探索。以下为可继续探索的方面：

（1）对于靶向肽的优化：针对靶向 S 蛋白的靶向肽 LCB1 还有一定可继续优化的空间，可以通过优化其蛋白序列改变与 S 蛋白 RBD 结构域的相互作用，提高靶向肽特异性。

（2）本文靶向编辑器连接子直接采用普遍的刚性与柔性连接子，并没有对其他刚性与柔性连接子进行比较测试。此外，连接子不同长度直接影响靶向编辑器去糖基化作用半径，后续可以构建带有不同长度连接子的靶向编辑器并对这些编辑器进行实验比较筛选出最佳连接子。

（3）本文靶向编辑器主体部分为切除一个 α - 螺旋的酿酒酵母来源去糖基化酶，在后续实验中可以对酵母来源去糖基化酶进行蛋白质理性与半理性设计，开发更佳的蛋白质靶向编辑器。

参考文献

- [1] GBD 2019 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990 - 2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019 [J]. *The Lancet. Neurology*, 2021, 20(10): 795 - 820.
- [2] Muralidar S, Ambi S V, Sekaran S, et al. The emergence of COVID - 19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS - CoV - 2 [J]. *Biochimie*, 2020, 179: 85 - 100.
- [3] Sun P, Lu X, Xu C, et al. Understanding of COVID - 19 based on current evidence [J]. *Journal of Medical Virology*, 2020, 92(6): 548 - 551.
- [4] Kirtipal N, Bharadwaj S, Kang S G. From SARS to SARS - CoV - 2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses [J]. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 2020, 85: 104502.
- [5] Zhou P, Yang X, Wang X, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270 - 273.
- [6] Kirtipal N, Bharadwaj S, Kang S G. From SARS to SARS - CoV - 2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses [J]. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 2020, 85: 104502.
- [7] Mu J, Xu J, Zhang L, et al. SARS - CoV - 2 - encoded nucleocapsid protein acts as a viral suppressor of RNA interference in cells [J]. *Science China. Life Sciences*, 2020, 63(9): 1413 - 1416.
- [8] Neuman B W, Kiss G, Kunding A H, et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology [J]. *Journal of Structural Biology*, 2011, 174(1): 11 - 22.
- [9] Risco C, Antón I M, Enjuanes L, et al. The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins [J]. *Journal of*

- Virology*, 1996, 70(7): 4773 - 4777.
- [10] Verdiá C, Torres J L, Alcaraz A, et al. Coronavirus E protein forms ion channels with functionally and structurally - involved membrane lipids [J]. *Virology*, 2012, 432(2): 485 - 494.
- [11] Neitthoffer B, Alvarez F, Larrous F, et al. A short sequence in the tail of SARS - CoV - 2 envelope protein controls accessibility of its PDZ Binding Motif to the cytoplasm [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2023: 105575.
- [12] Kovalenko I, Kholina E, Fedorov V, et al. Interaction of methylene blue with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 envelope revealed by molecular modeling [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(21): 15909.
- [13] Edara V, Pinsky B A, Suthar M S, et al. Infection and vaccine - induced neutralizing - antibody responses to the SARS - CoV - 2 B.1.617 Variants [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 385(7): 664 - 666.
- [14] Wang Z, Schmidt F, Weisblum Y, et al. mRNA vaccine - elicited antibodies to SARS - CoV - 2 and circulating variants [J]. *bioRxiv: The Preprint Server for Biology*, 2021: 2021.01.15.426911.
- [15] Wall E C, Wu M, Harvey R, et al. Neutralising antibody activity against SARS - CoV - 2 VOCs B.1.617.2 and B.1.351 by BNT162b2 vaccination [J]. *Lancet (London, England)*, 2021, 397(10292): 2331 - 2333.
- [16] Wibmer C K, Ayres F, Hermanus T, et al. SARS - CoV - 2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID - 19 donor plasma [J]. *Nature Medicine*, 2021, 27(4): 622 - 625.
- [17] Wu K, Werner A P, Koch M, et al. Serum neutralizing activity elicited by mRNA - 1273 vaccine [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2021, 384(15): 1468 - 1470.
- [18] Jackson C B, Farzan M, Chen B, et al. Mechanisms of SARS - CoV - 2 entry into cells [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022, 23(1): 3 - 20.

- [19] Tabata S, Imai K, Kawano S, et al. Clinical characteristics of COVID - 19 in 104 people with SARS - CoV - 2 infection on the diamond princess cruise ship: a retrospective analysis [J]. *The Lancet. Infectious Diseases*, 2020, 20(9): 1043 - 1050.
- [20] Sakurai A, Sasaki T, Kato S, et al. Natural history of asymptomatic SARS - CoV - 2 infection [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 383(9): 885 - 886.
- [21] Wu Z, McGoogan J M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID - 19) outbreak in china: summary of a report of 72 314 cases from the chinese center for disease control and prevention [J]. *JAMA*, 2020, 323(13): 1239 - 1242.
- [22] Massey D, Saydah S, Adamson B, et al. Prevalence of covid - 19 and long covid in collegiate student athletes from spring 2020 to fall 2021: a retrospective survey [J]. *BMC infectious diseases*, 2023, 23(1): 876.
- [23] Williams S G, Frain S, Guo H, et al. Clinical risk associated with COVID - 19 among 86000 patients with congenital heart disease [J]. *Open Heart*, 2023, 10(2): e002415.
- [24] Krijnen L J G, van Eldik W M, Mooren T T M, et al. Factors associated with mental health of young children during the COVID - 19 pandemic in the Netherlands [J]. *Child and Adolescent Psychiatry and Mental Health*, 2023, 17(1): 136.
- [25] Rauwerda N L, Kuut T A, Braamse A M J, et al. Insomnia and sleep characteristics in post COVID - 19 fatigue: A cross - sectional case - controlled study [J]. *Journal of Psychosomatic Research*, 2023, 177: 111522.
- [26] B L, A D, K L, et al. Viral infection and transmission in a large, well - traced outbreak caused by the SARS - CoV - 2 Delta variant [J]. *Nature communications*, 2022, 13(1).
- [27] Tian X, Li C, Huang A, et al. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus - specific human monoclonal antibody [J].

- Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 382 - 385.
- [28] Longsompurana P, Rungrotmongkol T, Plongthongkum N, et al. Computational design of novel nanobodies targeting the receptor binding domain of variants of concern of SARS - CoV - 2 [J]. *PloS One*, 2023, 18(10): e0293263.
- [29] Sternberg A, Naujokat C. Structural features of coronavirus SARS - CoV - 2 spike protein: Targets for vaccination [J]. *Life Sciences*, 2020, 257: 118056.
- [30] Yin W, Mao C, Luan X, et al. Structural basis for inhibition of the RNA - dependent RNA polymerase from SARS - CoV - 2 by remdesivir [J]. *Science (New York, N.Y.)*, 2020, 368(6498): 1499 - 1504.
- [31] Song A, Phandthong R, Talbot P. Endocytosis inhibitors block SARS - CoV - 2 pseudoparticle infection of mink lung epithelium [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1258975.
- [32] Jin Z, Zhao Y, Sun Y, et al. Structural basis for the inhibition of SARS - CoV - 2 main protease by antineoplastic drug carmofur [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2020, 27(6): 529 - 532.
- [33] Zhao F, Jia C, He F, et al. Site - specific profiling of N - glycans in drosophila melanogaster [J]. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 2023, 28(11): 278.
- [34] Korta P, Pocheć E. Glycosylation of thyroid - stimulating hormone receptor [J]. *Endokrynologia Polska*, 2019, 70(1): 86 - 100.
- [35] Zhao X, Chen H, Wang H. Glycans of SARS - CoV - 2 spike protein in virus infection and antibody production [J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021, 8: 629873.
- [36] Lehrbach N J, Breen P C, Ruvkun G. Protein sequence editing of SKN - 1A/Nrf1 by Peptide: N - glycanase controls proteasome gene expression [J]. *Cell*, 2019, 177(3): 737 - 750.e15.
- [37] Lehrbach N J, Ruvkun G. Endoplasmic reticulum - associated SKN - 1A/Nrf1 mediates a cytoplasmic unfolded protein response and promotes longevity [J]. *eLife*,

- 2019, 8: e44425.
- [38] Suzuki T, Park H, Kitajima K, et al. Peptides glycosylated in the endoplasmic reticulum of yeast are subsequently deglycosylated by a soluble peptide: N - glycanase activity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(34): 21526 - 21530.
- [39] Suzuki T. The cytoplasmic peptide:N - glycanase (Ngly1) - - basic science encounters a human genetic disorder [J]. *Journal of Biochemistry*, 2015, 157(1): 23 - 34.
- [40] Zhao G, Li G, Zhou X, et al. Structural and mutational studies on the importance of oligosaccharide binding for the activity of yeast PNGase [J]. *Glycobiology*, 2008, 19(2): 118 - 125.
- [41] Cao L, Goreshtnik I, Coventry B, et al. De novo design of picomolar SARS - CoV - 2 miniprotein inhibitors [J]. 2020: 7.
- [42] Chatterjee P, Ponnampati M, Kramme C, et al. Targeted intracellular degradation of SARS - CoV - 2 via computationally optimized peptide fusions [J]. *Communications Biology*, 2020, 3(1): 715.
- [43] Casas - Sanchez A, Romero - Ramirez A, Hargreaves E, et al. Inhibition of protein N-glycosylation blocks SARS - CoV - 2 Infection [J]. M. Mahalingam. *mBio*, 2022, 13(1): e03718 - 21.
- [44] Howell S J, Wilk D, Yadav S P, et al. Antimicrobial polypeptides of the human colonic epithelium [J]. *Peptides*, 2003, 24(11): 1763 - 1770.
- [45] Arif A, Chatterjee P, Moodt R A, et al. Heterotrimeric GAIT complex drives transcript - selective translation inhibition in murine macrophages [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2012, 32(24): 5046 - 5055.
- [46] Sampath P, Mazumder B, Seshadri V, et al. Noncanonical function of glutamyl - prolyl - tRNA synthetase: gene - specific silencing of translation [J]. *Cell*, 2004, 119(2): 195 - 208.

- [47] Chen L, Zhang Y - H, Wang S, et al. Prediction and analysis of essential genes using the enrichments of gene ontology and KEGG pathways [J]. *PloS One*, 2017, 12(9): e0184129.
- [48] Osman I O, Garrec C, De Souza G A P, et al. Control of CDH1/E - cadherin gene expression and release of a soluble form of e - cadherin in SARS - CoV - 2 infected caco - 2 intestinal cells: physiopathological consequences for the intestinal forms of COVID - 19 [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 798767.
- [49] Silfvast - Kaiser A, Paek S Y, Menter A. Anti - IL17 therapies for psoriasis [J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2019, 19(1): 45 - 54.
- [50] Furue K, Ito T, Tsuji G, et al. Psoriasis and the TNF/IL23/IL17 axis [J]. *Giornale Italiano Di Dermatologia E Venereologia: Organo Ufficiale, Societa Italiana Di Dermatologia E Sifilografia*, 2019, 154(4): 418 - 424.