



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

宿主因子 FUT8 调控冠状病毒复制的分子机制研究

THE MOLECULAR MECHANISM OF HOST FACTOR FUT8

REGULATING CORONAVIRUS REPLICATION

研究生: 项怡歆

CANDIDATE: XIANG YIXIN

学 号: 2021302110235

STUDENT NO.:

专 业: 兽医公共卫生与食品安全

MAJOR: VETERINARY PUBLIC HEALTH
AND FOOD SAFETY

导 师: 彭贵青 教授

SUPERVISOR: PROFESSOR PENG GUIQING

中国 武汉

WUHAN, CHINA

二〇二四年六月

JUNE, 2024

华中农业大学硕士学位论文

宿主因子 FUT8 调控冠状病毒复制的 分子机制研究

THE MOLECULAR MECHANISM OF HOST FACTOR FUT8 REGULATING CORONAVIRUS REPLICATION

研 究 生：项怡歆

学 号：2021302110235

指 导 教 师：彭贵青 教授

指 导 小 组：彭贵青 教授

史月军 副研究员

专业：兽医公共卫生与食品安全

研究方向：动物病毒学

获得学位名称：农学硕士

获得学位时间：2024 年 6 月

华中农业大学动物医学院

二〇二四年六月

目 录

1 文献综述.....	1
1.1 冠状病毒概述.....	1
1.2 冠状病毒复制周期.....	2
1.2.1 入侵.....	3
1.2.2 复制与组装.....	4
1.2.3 释放.....	4
1.3 冠状病毒复制所需宿主因子研究	5
1.3.1 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在宿主因子筛选中的应用	5
1.3.2 宿主因子参与冠状病毒复制的各个阶段	6
1.4 宿主与病毒的糖基化参与病毒复制	7
1.4.1 宿主蛋白的糖基化修饰.....	7
1.4.2 宿主蛋白糖基化参与病毒复制的研究进展	8
1.4.3 冠状病毒膜蛋白的糖基化修饰.....	9
1.5 宿主因子 FUT8 研究进展	10
1.6 冠状病毒疫苗与药物研究现状	13
1.6.1 冠状病毒疫苗研发现状.....	13
1.6.2 病毒靶向的抗病毒药物.....	13
1.6.3 宿主靶向的抗病毒药物.....	14
2 目的与意义.....	15
3 材料与方法.....	16
3.1 实验材料.....	16
3.1.1 细胞、菌株、毒株.....	16
3.1.2 载体与其他质粒.....	16
3.1.3 主要试剂耗材.....	17
3.1.4 主要仪器设备.....	19
3.1.5 常用缓冲液与试剂的配制.....	19
3.2 实验方法.....	21
3.2.1 构建 sgRNA 慢病毒载体质粒.....	21
3.2.2 大肠杆菌感受态细胞的制备(氯化钙法).....	24
3.2.3 连接产物的转化.....	25
3.2.4 挑取单克隆菌落及菌液 PCR.....	25
3.2.5 去内毒素小提质粒.....	26
3.2.6 细胞复苏及冻存.....	26
3.2.7 慢病毒包装.....	27

3.2.8 筛选阳性单克隆细胞系.....	28
3.2.9 Sanger 测序检验单克隆细胞系基因敲除效率	28
3.2.10 Western Blot 检验单克隆细胞系基因敲除效率.....	30
3.2.11 MTS 法检测单克隆细胞活力	32
3.2.12 间接免疫荧光实验(IFA).....	32
3.2.13 病毒滴度(TCID ₅₀)的测定	33
3.2.14 病毒扩增实验.....	33
3.2.15 Western Blot 实验验证 TGEV 复制情况	33
3.2.16 RNA 提取及反转录	33
3.2.17 荧光定量 PCR	34
3.2.18 透射电镜样品制备.....	36
3.2.19 双酶切及同源重组.....	36
3.2.20 TGEV-BAC 质粒提取	37
3.2.21 冠状病毒 S 蛋白介导的细胞-细胞膜融合实验	38
3.2.22 萤火虫荧光素酶报告实验.....	39
3.2.23 病毒吸附及内吞实验.....	39
3.2.24 流式结合及分析实验.....	39
3.2.25 病毒 RNA 的提取	40
3.3 统计分析.....	40
4 结果与分析.....	41
4.1 FUT8 敲除细胞系的构建及效果验证	41
4.1.1 利用 CRISPR/Cas9 技术在 PK-15 细胞上敲除 FUT8 基因	41
4.1.2 FUT8 基因敲除显著抑制的 TGEV 复制	42
4.1.3 FUT 家族其他成员敲除效果验证	43
4.2 TGEV 复制依赖于 FUT8 的核心岩藻糖基转移酶活性	45
4.2.1 回补 FUT8 酶活突变体无法回复 TGEV 的复制	45
4.2.2 岩藻糖基化转移酶抑制剂 2PF 影响 TGEV 的复制	46
4.3 TGEV 在 FUT8 敲除细胞系上的复制受损阶段探究	48
4.3.1 FUT8 敲除不影响 TGEV 在细胞内的复制	48
4.3.2 FUT8 通过酶活调控 TGEV 入侵阶段	49
4.3.3 FUT8 敲除通过影响 pAPN 抑制 TGEV 入侵	50
4.4 FUT8 通过核心岩藻糖基化调控宿主 pAPN 影响 TGEV 入侵	51
4.4.1 FUT8 敲除降低了 pAPN 与 TGEV-S 蛋白的结合效率....	51
4.4.2 pAPN N736 位点的核心岩藻糖基化影响 TGEV 的入侵...	52
4.5 FUT8 对其他以 APN 为受体的冠状病毒入侵过程的影响.....	55
4.5.1 fAPN N740 位点的核心岩藻糖基化影响 FIPV 的入侵.....	55

4.5.2 FUT8 敲除不影响 HCoV-229E 的入侵	57
4.6 FUT8 敲除影响 TGEV S 蛋白表达从而抑制病毒粒子形成	58
4.7 FUT8 敲除对 FIPV 和 HCoV-229E S 蛋白的影响	59
4.8 FUT8 敲除抑制 SARS-CoV-2 复制的多个阶段	60
4.8.1 SARS-CoV-2 在 FUT8 敲除细胞上的复制受损	60
4.8.2 SARS-CoV-2 在 FUT8 敲除细胞上的入侵和 S 蛋白表达受 损	60
5 讨论	62
5.1 宿主因子在冠状病毒家族复制过程中具有广谱的调控作用	62
5.2 病毒受体糖基化修饰对病毒复制的影响	62
5.3 病毒膜蛋白的糖基化修饰影响其稳定性	63
5.4 核心岩藻糖基化影响 SARS-CoV-2 感染的机制探究	64
5.5 宿主因子抑制剂抗病毒应用前景	64
6 结论	66
参考文献	67

摘要

冠状病毒是一类单股正链 RNA 病毒，其变异速度快、传播范围广，可引起多种呼吸道、消化道和神经系统疾病。由于冠状病毒的高突变率，多种针对病毒本身开发的疫苗及抗病毒药物难以提供理想的保护效果。近年来兴起的全基因组 CRISPR 筛选鉴定了多个冠状病毒复制所需宿主因子，这些宿主因子有望成为抗病毒药物的靶点并为抗病育种提供理论依据。本实验室前期在针对猪传染性胃肠炎病毒 (Transmissible Gastroenteritis Virus, TGEV) 宿主因子的全基因组文库筛选中发现，FUT8 基因敲除会显著抑制 TGEV 的复制，本研究将进一步探索 FUT8 基因影响冠状病毒复制的具体分子机制。

本研究的主要内容包括以下六个方面：

1、鉴定了宿主因子 FUT8，而不是 FUT 家族的其他成员，是 TGEV 复制所需关键宿主因子。

首先，我们构建了 FUT8 基因敲除(FUT8 Knock out, FUT8-KO)细胞系，并通过上清毒价测定、间接免疫荧光和 Western Blot (WB)等实验证明 TGEV 在 FUT8-KO 细胞系上的复制严重受损。并通过在细胞上分别敲除 FUT 家族其他成员 (FUT1-5, FUT7 和 FUT9-13) 证明 FUT 家族其他成员对于 TGEV 复制的影响均没有 FUT8 显著。综上所述，FUT8 是 TGEV 复制所必需的关键宿主因子。

2、TGEV 的复制依赖于 FUT8 的核心岩藻糖基转移酶活性。

为进一步探究 FUT8 酶活对 TGEV 复制的影响，我们将 FUT8 全长回补质粒和关键酶活位点突变质粒 FUT8-R365A 过表达回补到 FUT8-KO 细胞中，结果表明关键酶活位点突变后 FUT8 无法回复 TGEV 的复制。此外，在使用 FUT8 酶活抑制剂 2PF 处理细胞后，我们发现 TGEV 的复制能力与抑制剂浓度呈显著的负相关。以上结果证明，TGEV 的复制依赖于 FUT8 的核心岩藻糖基转移酶活性。

3、FUT8 通过核心岩藻糖基转移酶活性调控 pAPN 从而影响 TGEV 入侵阶段。

通过使用透射电镜观察细胞内部和检测 FUT8-KO 细胞中 TGEV 双链 RNA 合成情况，我们证明 TGEV 在 FUT8-KO 细胞中的早期复制严重受损。但直接转染 TGEV 的感染性克隆后，TGEV 在 FUT8-KO 细胞内的复制阶段没有受到抑制。吸附和内化实验的结果表明 TGEV 入侵阶段受损，抑制剂实验证明 FUT8 通过酶活调控 TGEV

的入侵阶段。实时定量 PCR(Real-time quantitative PCR, RT-qPCR)和膜融合实验的结果证明, 在宿主细胞 TGEV 受体猪氨基肽酶 N (pig amino peptidase N, pAPN)表达量一致的情况下, TGEV S 入侵 FUT8-KO 细胞上 pAPN 的效率显著降低。综上, FUT8 通过核心岩藻糖基转移酶活性调控 pAPN 从而影响 TGEV 入侵。

4、TGEV 受体 pAPN N736 位点的核心岩藻糖基化参与 TGEV 的入侵。

在通过流式结合实验证明 FUT8-KO 抑制 TGEV S 蛋白与 pAPN 的结合后, 本研究构建了 pAPN 全长表达质粒和 pAPN-N736A 突变质粒, 并通过流式结合实验和膜融合实验证明 pAPN N736 位点的核心岩藻糖基化对于 TGEV 入侵至关重要。接下来, 我们通过膜融合实验进一步研究了使用 APN 作为受体的猫传染性腹膜炎病毒(Feline Infectious Peritonitis Virus, FIPV), 证明了该机制具有一定的广谱性。

5、FUT8 敲除影响 TGEV S 蛋白正常表达从而抑制病毒粒子的形成。

反向膜融合实验的结果表明 FUT8-KO 细胞上表达的 TGEV S 入侵能力受损, WB 结果则证明 TGEV S 蛋白在 HEK293T-FUT8-KO 细胞中的表达严重受损。转染 TGEV 感染性克隆质粒后, RT-qPCR 的结果表明 FUT8-KO 细胞中 TGEV S 的 mRNA 水平与野生型没有显著差异, 蛋白表达水平则低于野生型; 上清毒价测定和 WB 结果证明 TGEV 病毒粒子的形成受到显著抑制。以上结果表明, FUT8-KO 通过影响 TGEV S 蛋白正常表达来抑制病毒粒子的形成。

6、FUT8 敲除对其他冠状病毒复制的影响。

我们分别构建了 Huh-7-FUT8-KO 和 VeroE6-FUT8-KO 细胞系, 并验证了 HCoV-229E 和 SARS-CoV-2 的感染效果, 发现 FUT8-KO 对于 HCoV-229E 的感染没有影响, 但显著抑制了 SARS-CoV-2 的复制。膜融合实验证明 SARS-CoV-2 在 FUT8-KO 细胞上的入侵阶段受损, WB 和反向膜融合则表明 SARS-CoV-2 S 蛋白的表达受损。以上结果表明, FUT8-KO 抑制 SARS-CoV-2 复制的多个阶段。

综上所述, 本研究证明 FUT8 是多种冠状病毒复制所必需的宿主因子, 并为抗病育种和抗病毒药物研发提供了理论依据。

关键词: 猪传染性胃肠炎病毒; 宿主因子; FUT8; APN; 核心岩藻糖基化

Abstract

Coronaviruses, a group of rapidly mutating and widely disseminated single-stranded positive-sense RNA viruses, are known to cause diverse respiratory, digestive, and neurological diseases. Given their high mutation rate, vaccines and antiviral drugs specifically developed against these viruses often fail to provide satisfactory protection. In recent years, genome-wide CRISPR screening has identified multiple host factors crucial for coronavirus replication, offering promising targets for antiviral drugs and providing a theoretical basis for disease resistance breeding. In our research, the FUT8 gene emerged as a significant suppressor of Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV) replication during genome-wide library screening of porcine host factors. This study aims at delve deeper into the specific molecular mechanisms of FUT8's impact on coronavirus replication.

The primary objectives of this research encompass the following six aspects:

1. FUT8, distinct from other FUT family members, was pinpointed as a crucial host factor for TGEV replication.

We established a FUT8 knockout (FUT8-KO) cell line and observed a significant impairment in TGEV replication through supernatant titration, indirect immunofluorescence, and Western blot analysis. Subsequently, we knocked out other FUT family members (FUT1-5, FUT7, FUT9-13) and discovered that none of them exerted a comparable effect on TGEV replication as FUT8. In conclusion, FUT8 stands out as a pivotal host factor for TGEV replication.

2. The replication of TGEV relies on the fucosyltransferase activity of FUT8.

To further elucidate the impact of FUT8's enzymatic activity on TGEV replication, we reinstated FUT8's functionality in FUT8-KO cells by overexpressing both the full-length FUT8 and a mutant, FUT8-R365A, with a disrupted key enzyme activity site. Notably, FUT8-R365A failed to restore TGEV replication, indicating that the enzyme's activity is vital. Additionally, treatment with the FUT8 enzyme inhibitor 2PF revealed a strong negative correlation between the inhibitor concentration and TGEV replication

ability. These findings collectively establish that the core fucosyltransferase activity of FUT8 is indispensable for TGEV replication.

3. FUT8 regulates the invasion stage of TGEV by modulating pAPN through its enzymatic activity.

Using transmission electron microscopy (TEM) to visualize intracellular processes and detect TGEV double-stranded RNA synthesis in FUT8-KO cells, we observed a significant impairment in early TGEV replication. However, after direct transfection of infectious TGEV clones, we found that TGEV replication within FUT8-KO cells was not inhibited. Adsorption and internalization experiments revealed a specific impairment in the invasion phase of TGEV, which was further supported by inhibitor studies demonstrating FUT8's enzymatic role in this process. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and membrane fusion assays subsequently showed that while the expression of the TGEV receptor, pig amino peptidase N (pAPN), was unaltered in FUT8-KO cells, its functionality was compromised. In conclusion, FUT8 regulates the invasion of TGEV by modulating pAPN through its enzymatic activity.

4. The core fucosylation of the TGEV receptor pAPN N736 is involved in the invasion of TGEV.

After FUT8-KO inhibited the binding of TGEV S protein to pAPN by flow cytometry, the full-length expression plasmid of pAPN and the pAPN-N736A mutant plasmid were constructed, and the core fucosylation of pAPN N736 site was proved to be essential for TGEV invasion by flow cytometry and membrane fusion experiments. Next, we further studied Feline Infectious Peritonitis Virus (FIPV) using APN as the receptor and demonstrated that this mechanism has a certain broad spectrum.

5. FUT8 knockout affects the normal expression of TGEV S protein and inhibits the formation of virions.

Next, the results of reverse membrane fusion experiments showed that the invasion ability of TGEV S protein expressed on FUT8-KO cells was impaired, and the WB results showed that the expression of TGEV S protein in FUT8-KO cells was severely impaired. After transfection of TGEV infectious cloning plasmid, the results of RT-PCR showed that there was no significant difference in the mRNA level of TGEV S in FUT8-KO cells

from that of wild type, but the protein level showed that the expression of TGEV S protein was severely impaired. The supernatant valence assay and WB results showed that the formation of TGEV virions was significantly inhibited. These results indicated that FUT8-KO inhibited virion formation by affecting the normal expression of TGEV S protein.

6. Effect of FUT8 knockout on replication of other coronaviruses.

To further assess the impact of FUT8 knockout on the replication of diverse coronaviruses, we generated Huh-7-FUT8-KO and VeroE6-FUT8-KO cell lines. These were then infected with HCoV-229E and SARS-CoV-2. Notably, FUT8-KO cells did not affect HCoV-229E infection, but significantly curtailed the replication of SARS-CoV-2. Membrane fusion assays revealed that the invasion phase of SARS-CoV-2 was particularly impaired in FUT8-KO cells. Western blot (WB) analysis and reverse membrane fusion experiments further corroborated this finding, indicating a compromised expression of the SARS-CoV-2 S protein. Collectively, these results imply that FUT8-KO suppresses multiple aspects of SARS-CoV-2 replication.

In conclusion, this study proves that FUT8 is an essential host factor for a variety of coronavirus infections, and provides a theoretical basis for disease resistance breeding and antiviral drug development.

Keywords: Transmissible Gastroenteritis Virus; host factor; FUT8; APN; Core fucosylation

缩略语表(Abbreviation)

英文缩写	英文全称	中文全称
ACE2	angiotensin-converting enzyme 2	血管紧张素转换酶 2
APN	amino peptidase N	氨基肽酶 N
CCoV	Canine Corona Virus	犬冠状病毒
CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	鼠癌胚抗原相关细胞粘附 分子 1
CoV	Coronavirus	冠状病毒
DMVs	double-membrane vesicles	双膜囊泡
DPP4	dipeptidyl peptidase 4	二肽基肽酶 4
ER	endoplasmic reticulum	内质网
ERGIC	endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment	内质网-高尔基体中间区 室
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FIPV	Feline Infectious Peritonitis Virus	猫传染性腹膜炎病毒
GeCKO	genome-wide CRISPR knockout	基因组规模 CRISPR 敲除
GFP	green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
HCoV-229E	Human Coronavirus 229E	人冠状病毒 229E
HCV	hepatitis C virus	丙型肝炎病毒
HEK-293T	Human embryonic kidney 293T	人胚胎肾细胞
His	Histidine	组氨酸
HR	homologous recombination	同源重组
IC	intermediate compartment	中间隔间
IFA	indirect immunofluorescence assay	间接免疫荧光法
kDa	Kilodalton	千道尔顿
KO	Knock out	敲除
LB	Luria-Bertani medium	LB 培养基
M	g/mol	摩尔质量
MERS-CoV	Middle East respiratory syndrome	中东呼吸系统综合征病毒

英文缩写	英文全称	中文全称
	coronavirus	
MHV	Mouse hepatitis virus	小鼠肝炎病毒
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
NHEJ	non-homologous end joining	非同源末端连接
PBS	Phosphate Buffer Saline	磷酸缓冲盐溶液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
PDCoV	Porcine Deltacoronavirus	猪丁型冠状病毒
PEDV	Porcine Epidemic Diarrhea Virus	猪流行性腹泻病毒
PEDV	Porcine epidemic diarrhea virus	猪流行性腹泻病毒
PRCV	Porcine Respiratory Coronavirus	猪呼吸道冠状病毒
RBD	receptor-binding domain	受体结合域
	Ribonucleic acid	
RNA		核糖核酸
	replication and transcription	
RTC		复制转录复合物
	complex	
rpm	revolutions per minute	转每分钟
	Real-time quantitative polymerase	
RT-qPCR	chain reaction	实时荧光定量 PCR
	Spike	
S		刺突
s, min, h, d	second, minute, hour, day	秒, 分钟, 小时, 天
	Severe Acute Respiratory	
SARS-CoV-2	Syndrome Coronavirus 2	新型冠状病毒
	small guide RNA	
sgRNA		向导 RNA
TGEV	Transmissible Gastroenteritis Virus	猪传染性胃肠炎病毒
VLPs	virus-like particles	病毒样颗粒
WB	Western Blot	蛋白质免疫印记法
μg, mg, g	Microgram, milligram, gram	微克, 毫克, 克
μL, mL, L	Microliter, milliliter, liter	微升, 毫升, 升

1 文献综述

1.1 冠状病毒概述

冠状病毒（Coronaviruses, CoV）可引起多种哺乳动物和禽类的呼吸道、消化道和神经系统的感染，严重威胁人类及其他动物的生命财产安全。

冠状病毒属于套式病毒目、冠状病毒科、冠状病毒属，是已知最大的正链 RNA 病毒，具有囊膜。RNA 病毒固有的高突变率和重组倾向使它们能够偶尔跨种传播并适应新的宿主和生态位(Lamkiewicz et al 2023)，这也使它们在自然界中具有极高的流行率。

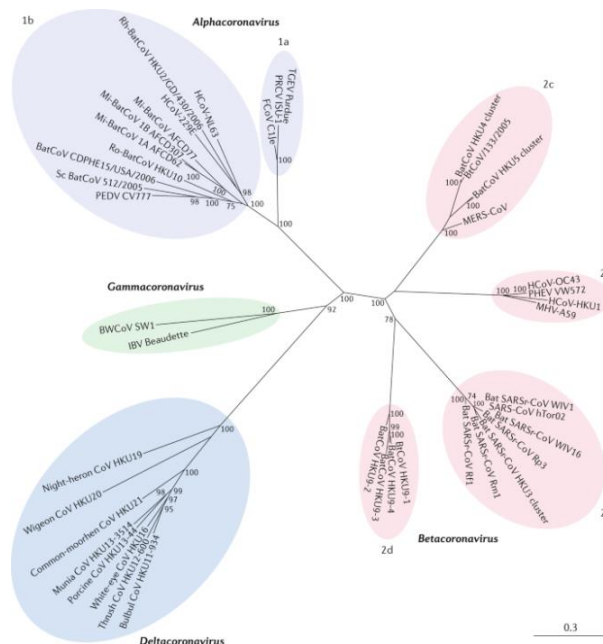


图 1-1 (α 、 β 、 γ 、 δ)冠状病毒系统发育树(Cui et al 2019)

Figure 1-1 Phylogenetic tree of the Coronavirinae family

CoV 家族有四个亚属： α 冠状病毒主要成员包括猪传染性胃肠炎病毒 TGEV(Transmissible Gastroenteritis Virus)、猫传染性腹膜炎病毒 FIPV(Feline Infectious Peritonitis Virus)、犬冠状病毒 CCoV(Canine coronavirus)、人冠状病毒 HCoV-229E(Human Coronavirus 229E) 和猪呼吸道冠状病毒 PRCV(Porcine Respiratory Coronavirus)（TGEV 的基因缺失变异株）等。 β 冠状病毒主要成员有：严重急性呼吸道综合征病毒 SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2)等，一般只感染哺乳动物。而 γ 冠状病毒和 δ 冠状病毒除了哺乳动物外还可感染禽类(Cui et al 2019)。

TGEV 属于 α 冠状病毒，于 1946 年在美国首次被报道，随后在世界各地的猪群中均有报道(Yan et al 2022)。TGEV 引起猪感染的主要症状为消化道症状，包括呕吐和频繁剧烈的水样腹泻。无对应抗体的仔猪感染后的死亡率可以达到 100%(Zhang et al 2007)。目前 TGEV 主要使用减毒活疫苗来控制 TGEV 的传播，主要原理是通过促进泌乳母猪产生抗体，抗体通过乳汁传递给仔猪来暂时提高仔猪对 TGEV 的抵抗力(Song et al 2023)。但是，随着母源抗体滴度的降低，疫苗对仔猪的保护作用也会逐渐减弱。

1.2 冠状病毒复制周期

冠状病毒是一类正链 RNA (+RNA) 病毒，其基因组规模庞大，大约在 26-32 千碱基 (kb) 之间。其基因组主要编码两种聚合酶 pp1a 和 pp1b、四种常见的 CoV 结构蛋白 (S、E、M 和 N) 以及其他辅助蛋白(de Wilde et al 2018)。

CoV 与细胞表面的特定受体结合后，通过直接与细胞膜融合（或在体内中被摄取）进入并将 RNA 基因组释放到胞质溶胶中。正链 RNA 与宿主细胞核糖体结合，翻译产生 pp1a 和 pp1ab 复制酶多蛋白。这两种多蛋白在多种内部蛋白酶的切割下形成一系列非结构蛋白(Non-structure Protein, NSP)，即 NSP 1-16。这些 NSP 提供病毒 RNA 复制酶的亚基并参与病毒复制转录复合物的生物发生。其中包括双膜囊泡(double-membrane vesicles, DMVs)——病毒复制细胞器(Prydz and Saraste 2022)。病毒在 DMV 中产生全长和亚基因组长度的负链 RNA。后者分别在游离或内质网膜结合核糖体中合成四种病毒结构蛋白：核衣壳 (N) 蛋白和三种膜蛋白 (E、M 和 S)。最终，新的基因组被装入核衣壳内，并通过从平滑细胞内膜的出芽作用获得包膜。之后，新的病毒粒子通过外细胞途径（胞吐等）离开细胞(Prydz and Saraste 2022)。

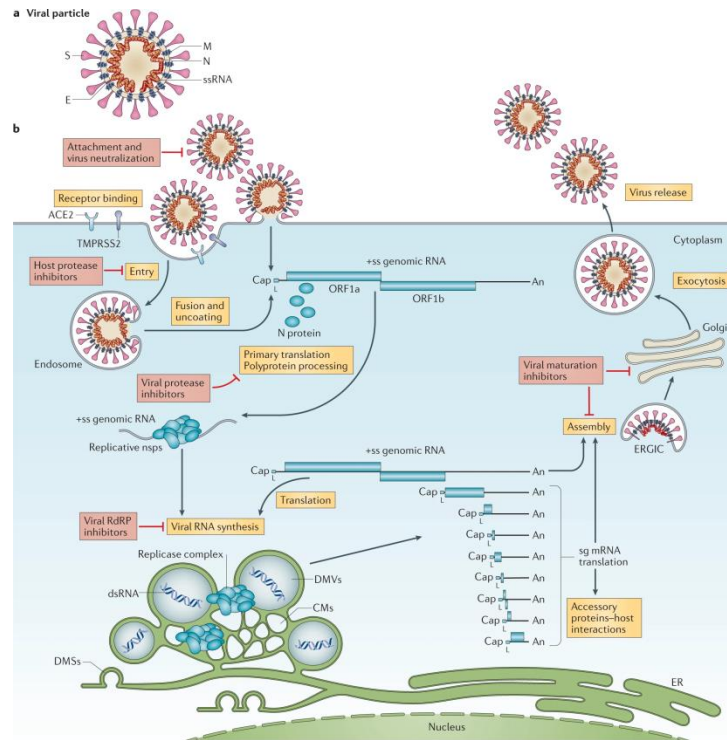


图 1-2 冠状病毒细胞内复制周期简介(V'Kovski et al 2021)

Figure 1-2 Intracellular life cycle of the coronavirus

1.2.1 入侵

入侵是冠状病毒复制周期中的首个关键步骤，这一步的主要决定因素是冠状病毒 S 蛋白与宿主细胞表面受体的有效结合(de Wilde et al 2018)。

冠状病毒的 S 蛋白是一种膜蛋白，它是冠状病毒中最大的糖蛋白(Wang et al 2016)。S 蛋白包括两个亚基 S1 和 S2，它以三聚体的形式存在于病毒粒子表面(Li 2016)。S1 亚基参与病毒和受体的结合，并包含 N 端和 C 端结构域（分别为 S1-NTD 和 S1-CTD）(Walls et al 2016)，两者都可以充当病毒的受体结合域(receptor-binding domain, RBD)，且 S1-CTD 还决定了冠状病毒的细胞嗜性。而高度保守的 S2 亚基则包含促进病毒-细胞膜融合的关键区域(Hulswit et al 2016)。病毒 S 蛋白使用双重受体机制，即同时与糖类和蛋白质结合以附着和进入宿主细胞，从而引起感染(Guruprasad 2021)。

冠状病毒 S 蛋白在介导病毒包膜与靶细胞膜融合的过程中，除了依赖细胞表面提供的受体，还需要借助宿主细胞表达的蛋白酶进行切割(V'Kovski et al 2021)。现有研究表明，SARS-CoV-2 利用细胞跨膜丝氨酸蛋白酶 TMPRSS2 的切割作用来实现其激活和入侵(Gierer et al 2013)。

流感病毒的 HA 需要低 pH 值来激活糖蛋白融合机制，类似的机制在冠状病毒上也有报道(Whittaker et al 2021)。一项使用单颗粒追踪将猫冠状病毒（feline coronavirus, FCoV）融合到支撑双层的研究表明，S 蛋白介导的假病毒粒子膜融合需要蛋白酶处理和酸性环境才能融合(Costello et al 2013)。还有研究发现 MHV 对细胞的入侵效率也受环境 pH 值的影响(Burkard et al 2014)。这些研究表明 pH 值是病毒入侵过程中不可忽视的因素。

总而言之，冠状病毒对宿主细胞的入侵由三重因素决定：受体结合、宿主蛋白酶切割和细胞的离子环境三者协同工作，以促进病毒和细胞的膜融合(Whittaker et al 2021)。

1.2.2 复制与组装

在与靶细胞膜融合后，病毒的核衣壳在细胞外脱落，而基因组释放到细胞内。首先，冠状病毒的正链 RNA 与宿主细胞核糖体结合，引导非结构蛋白的合成(Knoops et al 2008)。非结构蛋白提供病毒 RNA 复制酶的亚基，并对被感染细胞的细胞内膜进行重排以建立病毒复制工厂，病毒基因组在其中进行复制和转录(Snijder et al 2020; Weber et al 2006)。病毒复制工厂包括双膜囊泡(double-membrane vesicles, DMVs)，也就是病毒 RNA 复制和转录的位点(Fehr and Perlman 2015)。接下来，DMVs 中产生的基因组和亚基因组 mRNA 通过分子孔离开 DMV(Wolff et al 2020)。进入细胞质后，这些 mRNA 在粗面内质网的核糖体中翻译产生病毒包膜蛋白 E、M 和 S，核衣壳蛋白 N 则是在游离核糖体上合成的(Prydz and Saraste 2022)。

翻译产生的三种跨膜蛋白（E 蛋白、M 蛋白和 S 蛋白）在插入内质网膜后被转运到中间隔间(intermediate compartment, IC)。N 蛋白通过包被病毒的 RNA 基因组来启动组装；M 蛋白参与病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs)的形成和病毒出芽(Lu et al 2021)；VLP 的形成也需要 E 蛋白(Xu et al 2020)；S 蛋白不是 VLP 形成所必需的，但对病毒感染性至关重要。这四种蛋白质在 IC 中共定位，以确保组装成功能齐全的病毒颗粒(Wang et al 2020)。

1.2.3 释放

病毒粒子的释放是冠状病毒周期中人们了解最少的步骤之一。通常认为病毒粒子是通过生物合成分泌途径释放，这些病毒粒子萌芽进入内质网-高尔基体中间区室，

然后通过分泌囊泡的运输释放到细胞外空间(Gudima et al 2023)。最近的一项研究表明, β 冠状病毒利用溶酶体运输进行释放(Ghosh et al 2020)。

同时, 一项针对感染 SARS-CoV-2 的 Vero 细胞的冷冻成像结果显示, 含有病毒的大型囊泡与细胞膜融合而成可供病毒粒子释放的隧道, 从而允许通过胞吐作用样机制释放大量病毒颗粒(Gudima et al 2023)。

1.3 冠状病毒复制所需宿主因子研究

1.3.1 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在宿主因子筛选中的应用

细菌和古细菌中成簇的规则间隔短回文重复序列 (CRISPR) 和 CRISPR 相关蛋白 9 (Cas9)系统是细菌本身针对噬菌体感染和质粒转移所演化出的一种防御机制 (Jinek et al 2012), 其原理是采用 gRNA 引导 DNA 核酸内切酶 Cas9, 特异性切割入侵的双链 DNA, 使其断裂以达到防御的效果(Gupta et al 2019)。研究者根据这种特性, 将其修改成为多功能、特异性强且具有普适性的基因组编辑工具(Cong et al 2013)。CRISPR/Cas9 系统包括两种最重要的成员: gRNA 和 Cas9 内切酶, 其中 gRNA 会引导 Cas9 蛋白来切割目标基因组上的特定 DNA 序列(Jiang and Doudna 2017)

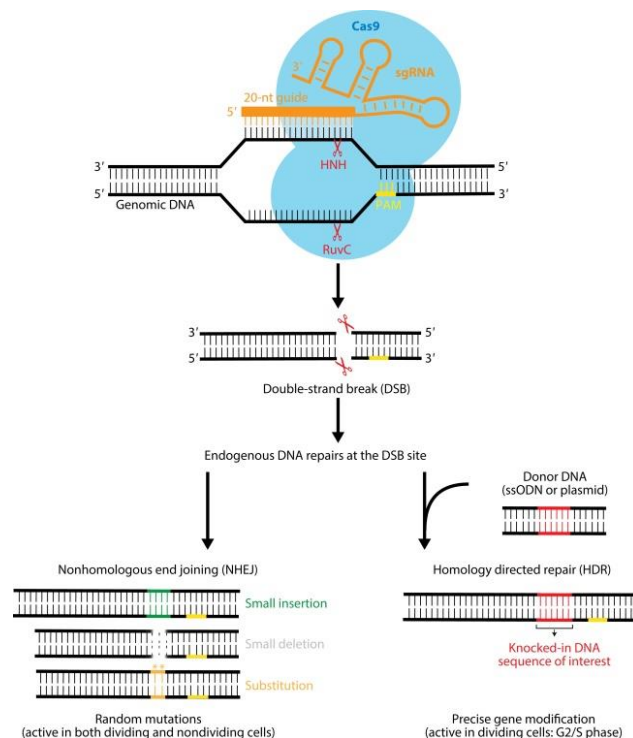


图 1-3 CRISPR/Cas9 基因编辑原理(Jiang and Doudna 2017)

Figure 1-3 The mechanism of CRISPR–Cas9–mediated genome engineering

Guide RNA(gRNA)由单链 RNA(20bp)组成。gRNA 的 5'末端与目标 DNA 序列互补, 为其基因组目标提供序列特异性(Cong et al 2013)。Cas9 蛋白具有 6 个结构域, 其中 PAM 相互作用结构域赋予 PAM 特异性, 负责靶 DNA 序列的结合(Deltcheva et al 2011)。

gRNA 通过与 Cas9 酶结合诱导其构象产生变化并激活(Gupta et al 2021)。在 Cas9 酶被激活后, gRNA 就会靶向 DNA 序列 3'端与 PAM 序列相邻的位点并找到目标序列, 而与之结合的 Cas9 蛋白会解链 PAM 上游的碱基并与 gRNA 的互补区域配对(Zhang et al 2014)。如果互补区域和目标区域正确配对, Cas9 酶可以发挥其通用核酸内切酶的功能切割目标 DNA 从而引起 DNA 双链断裂(一般位于 PAM 序列上游 3-4 个碱基处)。断裂的 DNA 双链会被细胞通过内源性细胞修复途径修复(Gratz et al 2013)。而这种修复通常会引起任意数目的碱基对的插入或删除, 使目标基因产生移码突变丧失原有的功能从而导致基因的沉默或敲除(Gupta et al 2019)。

近年来, 许多研究已成功利用 CRISPR/Cas9 技术批量筛查病毒感染过程中发挥不同作用的宿主因子。在针对甲型流感病毒感染的宿主因素筛查中, 研究者鉴定了宿主因子 WDR7、CCDC115 和 TMEM199, 并证明这些基因对于病毒进入和调节 V 型 ATP 酶组装至关重要(Li et al 2020)。Rebendenne 等人通过双向全基因组 CRISPR 筛选(功能丧失的 CRISPR-KO 筛选和功能获得性 CRISPRa 筛选)显示了调节 MERS-CoV 的宿主因素(Rebendenne et al 2022)。之后进行的另一项研究在人肺上皮细胞中进行了类似的全基因组敲除和激活筛选, 鉴定出粘蛋白(一个高分子量糖蛋白家族)发挥了强大的抗病毒作用(Biering et al 2022)。

1.3.2 宿主因子参与冠状病毒复制的各个阶段

各种冠状病毒的爆发与流行推动了对其所需的宿主因子研究的迅猛发展。迄今为止已有多项针对冠状病毒的 CRISPR 的全基因组筛选研究(Biering et al 2022; Daniloski et al 2021; Sun et al 2021; Wang et al 2022), 这些研究成功鉴定了多种病毒所需的宿主基因。

入侵阶段: 首先, 宿主细胞上的对应受体是病毒入侵过程中至关重要的因素。迄今为止, 已有四种宿主细胞蛋白质被表征为冠状病毒与宿主细胞结合的主要受体(Millet et al 2021)。如 α 冠状病毒属的 TGEV、FIPV、CCoV 和 HCoV-229E 使用其各自宿主物种的氨基肽酶 N (amino peptidase N, APN) 作为受体。SARS-CoV 和

SARS-CoV-2 已被证明使用血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 作为受体。宿主因子 DYRK1A 的敲除会显著抑制 APN 和内吞相关基因的表达, 从而抑制 TGEV 的入侵(Fu et al 2024)。对于冠状病毒受体的探索仍在不断进行中, 除了已知的受体 (ACE2、TMPRSS2) 之外, 有研究证明 LDLRAD3 和 CLEC4G 以不依赖 ACE2 的方式介导 SARS-CoV-2 的入侵(Zhu et al 2022)。

复制阶段: 细胞胞苷/尿苷一磷酸激酶 2(CMPK2)通过增加 ddhCTP 的产生和抑制病毒的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RdRp)活性来抑制冠状病毒的复制(Zhu et al 2023)。有研究表明, mLST8 基因通过 mTORC1 通路调节自噬, 同时还会影响冠状病毒复制过程中双膜囊泡的形成(Fu et al 2023)。宿主糖原合酶激酶 3(GSK-3)可磷酸化 MHV 的核衣壳以募集 RNA 解旋酶 DDX1 参与病毒复制(Wu et al 2014)。而宿主因子 FAM149B1、CCAR2 和 ZC3HAV1 在 SARS-CoV-2 重塑细胞内膜系统以形成双膜囊泡的过程中发挥作用(Pahmeier et al 2023)。

释放阶段: 有研究表明宿主的 Arf 样小 GTP 酶 Arl8b 参与调节 β 冠状病毒利用溶酶体运输进行出口的过程(Ghosh et al 2020)。编码赖氨酸脱甲基酶的 LSD1 基因的敲除会阻断 SARS-CoV-2 通过溶质通路释放至细胞外的途径(Mazzarella et al 2023)。

1.4 宿主与病毒的糖基化参与病毒复制

1.4.1 宿主蛋白的糖基化修饰

糖基化是蛋白质最常见、最多样化的翻译后修饰之一。蛋白质糖基化是单糖或聚糖与蛋白质的氨基酸侧链共价连接的过程。聚糖是单糖的线性或支链连接, 通常具有高溶解度和构象熵, 可调节蛋白质的折叠、结构和功能(Reily et al 2019)。其中酶促蛋白质糖基化过程主要在内质网和高尔基体系统进行, 该过程会导致大多数 (>85%)分泌蛋白的糖基化(Schjoldager et al 2020)。

目前已经报道了几种不同的蛋白质糖基化。N-糖基化是一种发生在分泌蛋白和膜结合蛋白中的翻译后修饰, N-糖基化的蛋白都有一个共同的基序 (NXS/T, 其中 X 不能是脯氨酸) (Breitling and Aebi 2013)。N-糖基化将复杂程度不等的糖 (包括岩藻糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖等) 选择性地附着到天冬酰胺 (或不太常见的精氨酸) 残基中(Cherepanova et al 2016)。而在 O-糖基化中, 则主要是将单糖或聚糖添加到丝氨酸、苏氨酸(Cervoni et al 2020)。其他种类的蛋白质糖基化, 例如 C-糖基化 (其

中色氨酸被甘露糖修饰), 以及 S-糖基化 (其中半胱氨酸被修饰) 都不太常见(Eichler 2019)。

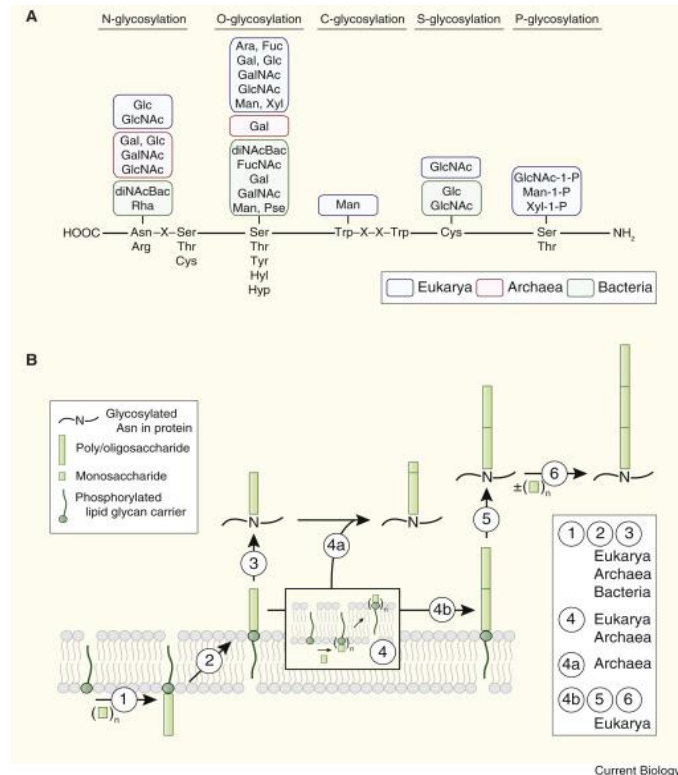


图 1-4 进化过程中的蛋白质糖基化(Eichler 2019)

Figure 1-4 Protein glycosylation across evolution.

1.4.2 宿主蛋白糖基化参与病毒复制的研究进展

多项机理研究证明, 宿主细胞的糖基化在多种病毒的进入过程中发挥了重要作用。去除细胞 N-糖基化可抑制人成纤维细胞中人巨细胞病毒的感染, 且这种抑制在 N-糖基化恢复后消失(Zheng et al 2020)。在使用 PNGase 去除细胞上的 N-糖基化后, HIV 感染效率显著降低(Spillings et al 2022)。有研究表明, 使用小分子抑制剂 kifunensine 在寡甘露糖阶段阻断 N-聚糖的生物合成可显著减少 SARS-CoV-2 进入表达 ACE2 的 HEK293T 细胞(Yang et al 2020)。宿主细胞粘蛋白可保护 Vero 细胞不受 HCoV-OC43 感染, 而通过唾液酸酶去除粘蛋白上连接的唾液酸聚糖则会消除这种保护作用(Wardzala et al 2022), 粘蛋白上的岩藻糖基化位点也在其中发挥了重要作用(Behren et al 2023)。溶质载体家族 35 成员 A1 (SLC35A1) 是唾液酸合成途径中的关键分子, 敲除 SLC35A1 基因会导致细胞表面唾液酸和 PDCoV 吸附的量减少(Wang et al 2022)。

TGEV 的受体 pAPN 的 Asn736 糖基化位点的缺失会消除 TGEV RBD 与 pAPN 的结合(Reguera et al 2012)。犬、猫 APN 中同源聚糖的缺失同样可以防止猫、犬和猪冠状病毒的细胞感染，而将这种聚糖添加到人 APN 中则足以使其成为 TGEV 的受体(Tusell et al 2007)。

1.4.3 冠状病毒膜蛋白的糖基化修饰

除了宿主细胞的糖基化以外，病毒蛋白本身的糖基化对于病毒的复制也是不可或缺。以 SARS-CoV-2 为例，计算机模拟拓扑结构的预测结果显示，SARS-CoV-2 大多数编码的蛋白质是糖蛋白，但迄今为止只有四种有确切的糖基化位点报告(Gong et al 2021)。众所周知，S 蛋白是一种糖蛋白，其上修饰的聚糖占据了约 40%的 S 蛋白三聚体表面(Rudd et al 2001)。目前总共报道了 23 种高占有率（大部分为>95%）的 N-连接糖基(Zhang et al 2021)。相比之下，在所有 O-连接糖基中，只有两个位点显示出相对较高的占有率(Watanabe et al 2020)。研究表明 SARS-CoV-2 S 蛋白表面的 N-糖基化在调节病毒入侵方面发挥了重要作用，使用 RNA 干扰剂或抑制剂去除新生的 SARS-CoV-2 S 蛋白的 N-糖基化可减少感染的传播，在这些条件下新生病毒粒子数量减少，且部分子代病毒粒子完全失去了感染性(Casas-Sanchez et al 2021)。

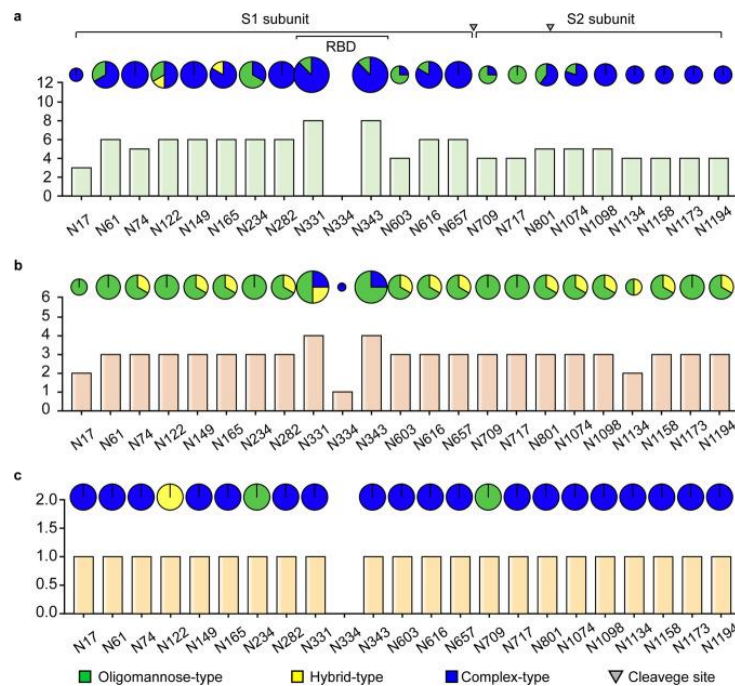


图 1-5 SARS-CoV-2 S 蛋白的 N-聚糖类型(Cong et al 2013)

Figure 1-5 N-glycan types of SARS-CoV-2 S proteins

SARS-CoV-2 的 E 蛋白在病毒的组装和释放中发挥重要功能。根据序列预测，在 E 蛋白的跨膜片段中的 N48 和 N66 位置可能存在两种假定的 N-连接糖基化位点 (Duart et al 2020)。M 蛋白是 SARS-CoV-2 中含量最丰富的包膜蛋白，参与病毒颗粒的组装。与 E 蛋白类似，M 蛋白的糖基化尚未得到广泛的研究和表征。计算机模拟揭预测了 8 种 N-糖基化位点，包括 N5、N21、N41、N43、N117、N121、N203 和 N216 这些 N-连接糖基化的功能仍有待研究 (Dawood 2021)。ORF3a 是一种非结构蛋白，位于 SARS-CoV-2 表面。根据疏水性分析和拓扑学研究，在其 S27、T28、T32 和 T34 残基处可能存在 4 种 O-连接糖基，但不存在 N-糖基化位点。这些糖基化的功能仍有待进一步的研究 (Majumdar and Niyogi 2020)。

1.5 宿主因子 FUT8 研究进展

岩藻糖基化，一种发生在高尔基体和内质网内的糖基化修饰 (Fujita et al 2021)。岩藻糖可以掺入 N-、O-或脂质连接的寡糖链的末端部分，或修饰复合物 N-聚糖的核心 (Schneider et al 2017)。岩藻糖基化水平决定于岩藻糖基转移酶活性及其供体底物二磷酸鸟苷 (GDP)-岩藻糖合成酶的水平 (Takahashi et al 2009)。岩藻糖基转移酶家族共有 13 个成员，主要可以分为两种：末端岩藻糖基化酶和核心岩藻糖基化酶 (Bastian et al 2021)。而 FUT8 (Fucosyltransferase 8)，也就是 α -(1,6)-岩藻糖基转移酶 (Alpha-(1,6)-Fucosyltransferase)，是其中唯一一种负责核心岩藻糖基化的转移酶 (Miyoshi et al 2008)。

Common Name(s)	Abbreviation	Representative Major Product(s)
H blood group α 2fucosyltransferase	^a FUT1	H antigen, type 2
Secretor (Se) blood group α 2fucosyltransferase	^a FUT2	H antigen, type 1
Fuc-TIII α 3/4fucosyltransferase	^a FUT3	Sialyl-Lewis ^x Sialyl-Lewis ^a Lewis ^b Lewis ^x Lewis ^a Lewis ^y
Fuc-TIV α 3fucosyltransferase	^a FUT4	
ELAM-1 ligand fucosyl transferase		
Fuc-TV α 3fucosyltransferase	^a FUT5	
Fuc-TVI α 3fucosyltransferase	^a FUT6	
Fuc-TVII α 3fucosyltransferase	^a FUT7	
Fuc-TVIII α 6fucosyltransferase	^b FUT8	
Fuc-TIX α 3fucosyltransferase	^a FUT9	
Fuc-TX α 3fucosyltransferase	^c FUT10	Unknown
Fuc-TXI α 3fucosyltransferase	^c FUT11	Unknown
Protein O- fucosyltransferase 1	^d POFUT1 / FUT12	
Protein O- fucosyltransferase 2	^e POFUT2 / FUT13	

图 1-6 13 种岩藻糖基化转移酶(Schneider et al 2017)

Figure 1-6 List of 13 known fucosyltransferases

作为唯一的核岩藻糖基化转移酶,FUT8 在哺乳动物细胞高尔基体中催化岩藻糖从 GDP-岩藻糖(GDP-Fuc)转移到 N-聚糖的最内层 N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)残基的 α -(1,6)键(Lin et al 2011),从而完成核岩藻糖糖基化的功能。底物 GDP-Fuc 的水平及其向高尔基体的运输决定了蛋白质的核岩藻糖基化水平(Norton and Mehta 2019)。同时,一项对于 FUT8 酶活的活性测定表明,用丙氨酸取代其 365 位点上的精氨酸会导致 FUT8 的酶活完全丧失(Takahashi et al 2000)。

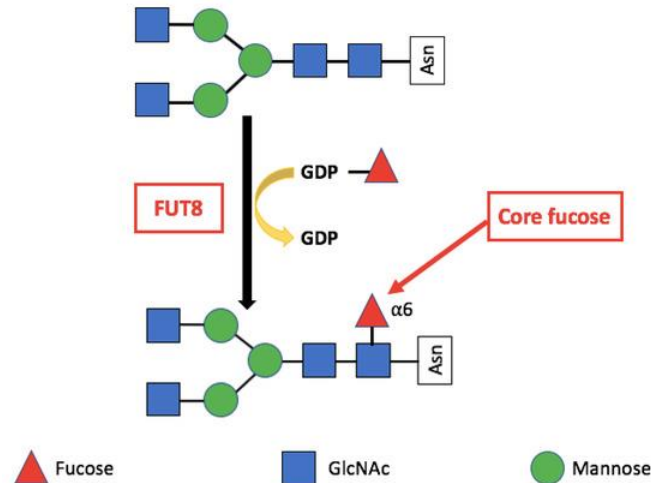


图 1-7 FUT8 催化的反应(Bastian et al 2021)

Figure 1-7 The reaction catalysed by FUT8

核心岩藻糖基化后，蛋白质会表现出与之前不同的空间结构和生物活性(Golay et al 2022)。FUT8 参与多种类型的生理和病理过程和免疫反应，例如细胞生长、粘附、受体激活、ADCC、肿瘤转移和病毒感染体液免疫反应以及胃肠道系统的良恶性生物调节(Cantero-Recasens et al 2022; Chen et al 2013; Shi et al 2024; Takamatsu et al 2016)。核心岩藻糖基化在生长因子受体中起重要作用，如 TGF- $\beta 1$ 和 EGFR 介导的生物学功能(Kelel et al 2021; Tu et al 2017)。在小鼠中，FUT8 的纯合敲除会诱导严重的生长迟缓和出生后发育期间的早期死亡(Wang et al 2006)。

病毒的存活与复制依赖于宿主细胞的各项结构，并选择宿主细胞的不同机制来复制、组装和释放新的病毒颗粒(Kim et al 2019)，而宿主的 FUT8 基因在病毒复制的过程中发挥了重要的功能。有报道称，HCV 可以通过操纵宿主转录因子 SNAIL 来激活 EGFR-AKT-SNAIL 通路从而诱导 FUT8 表达的上调。而 FUT8 表达量的上升会促进 RIM40 介导的 RIG-I K48-泛素化，并抑制抗病毒干扰素 (IFN) -I 的反应(Pan et al 2024)。

本实验室在对 TGEV 宿主因子的前期筛选中，利用全基因组 CRISPR/Cas9 敲除文库鉴定了多个影响 TGEV 复制的关键宿主因子(Sun et al 2021)。本研究发现 FUT8 基因敲除后显著抑制 TGEV 的复制，因此我们推测 FUT8 可作为一个新的宿主因子参与猪传染性胃肠炎冠状病毒的复制。

1.6 冠状病毒疫苗与药物研究现状

1.6.1 冠状病毒疫苗研发现状

自 SARS-CoV-2 爆发以来,我国主要通过疫苗预防和治疗。然而,由于疫苗和中和抗体仅针对病毒的表面结构蛋白,其保护效率很容易受到病毒突变的影响(Xia et al 2023)。目前的 COVID-19 疫苗在早期阶段被证明在遏制大流行方面非常有效。但免疫选择下新出现的 SARS-CoV-2 Omicron 变异株大大削弱了当前疫苗在预防感染和传播方面的有效性(Zhou et al 2022)。这造成了一个两难境地,即尽管疫苗在预防严重疾病方面仍然有效,但持续的感染浪潮增加了变种永无止境的出现的可能性(Tan et al 2023)。同时,疫苗的接种还带来了一些副作用与不良反应。SARS-CoV-2 疫苗的不良反应主要包括以下几个方面:过敏反应(特别是 mRNA 疫苗)(Shimabukuro and Nair 2021)、血栓形成和血小板减少症(特别是腺病毒载体疫苗)(Mehta et al 2021)、心肌炎(特别是 mRNA 疫苗)(Heinz and Stiasny 2021)和神经系统不良反应(与病毒载体疫苗有关)(McKean and Chircop 2021)。同时,除了具有抗原成分外,疫苗还携带各种佐剂,这些佐剂可能会在宿主中引起一些副作用或毒理学反应(Joshi et al 2021)。

猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)对全世界的养猪业造成了巨大的损失,但目前市场上仍缺乏有效的疫苗。疫苗保护效率低下的原因有以下几点:(1)目前的 IM 疫苗(活的或灭活的)诱导怀孕母猪泌乳免疫的能力较差;(2)疫苗针对的毒株与流行毒株不同(Jung et al 2020);(3)通过常规细胞培养适应方法生产的活疫苗在田间应用后可能会恢复为毒性强的 PEDV 或与田间 PEDV 毒株重新组合以产生新的毒株(Hou and Wang 2019)。

1.6.2 病毒靶向的抗病毒药物

多年来,大多数传统抗病毒药物的开发是直接针对病毒本身的结构或者成分。然而,由于病毒本身快速变异导致的耐药性病毒的迅速生成使这一策略往往存在一定的局限性。

核苷类似物 5-氟尿嘧啶(5-FU)和利巴韦林(RBV)靶向冠状病毒 RNA 聚合酶(Eltahla et al 2015),但冠状病毒的 3'-5'核糖核酸外切酶(ExoN)校对并去除了药

物引入的核苷类似物，导致了耐药性的产生(Smith et al 2013)。一种常用于抗病毒的经典药物金刚烷，其作用机制是阻断甲型流感的 M2 离子通道从而防止病毒脱壳和 RNA 释放。到 2013 年，全球流行的甲型流感亚型中约有 45%对金刚烷耐药（>69%的 H1 亚型和 43%的 H3 亚型）(Hussain et al 2017)。由于耐药性如此之高，金刚烷类药物不再被推荐用于治疗甲型流感(Hurt et al 2012)。有研究表明 SARS-CoV-2 很容易产生对奈玛特韦（一种靶向 3CL 的口服抗病毒药物）的体外高水平耐药性，并且这种耐药性可以通过多种途径产生(Iketani et al 2023)。

1.6.3 宿主靶向的抗病毒药物

在病毒靶向的药物开发受阻时，开发宿主靶向的抗病毒药物以控制病毒感染可能是一种更有效的通用方法(Goris et al 2008)。病毒在复制过程中会与多种宿主因子和途径建立相互作用，近年来兴起了一类针对病毒所需宿主因子的抗病毒药物，这种药物被称为宿主靶向的抗病毒药物(Kumar et al 2020)。目前研究者主要通过两种方法：全基因组小干扰 RNA(siRNA)或 CRISPR 筛选，得到与感染病毒相互作用并调节复制的细胞编码基因，并针对这些基因开发小分子抑制剂(Venter et al 2015)。

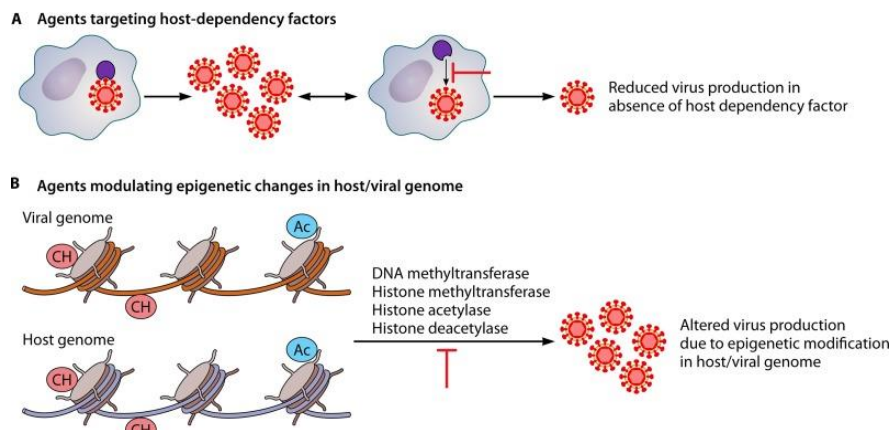


图 1-8 抗病毒药物开发的新策略(Krarp et al 2015)

Figure 1-8 New strategies for antiviral drug development

由于宿主的遗传变异率与病毒相比非常低，宿主导向的抗病毒药物失效的几率也大大降低(Kumar et al 2018)，此外，它还可能适用于多种利用共同分子途径的病毒(Pichlmair et al 2012)。宿主导向的抗病毒药物又可以分为两种：一种是针对对病毒感染有反应的宿主活动，如干扰素（IFN）和适应性免疫反应等(Wallis et al 2023)，这些药物可以改变感染的结果。第二种则是靶向对病毒复制不可或缺的宿主因子和

通路。

已有多项研究表明,某些对宿主本身影响不大的宿主因素对病毒复制至关重要。如麻疹病毒(MeV)的RNA合成和病毒体组装所需的宿主细胞因素,包括HSP72、Prdx1、管蛋白和壳蛋白激酶等(Delpeut et al 2012)。Lasswitz L 等将人类跨膜蛋白CD81确定为基孔肯雅病毒(CHIKV)复制所需的宿主因子,CD81的敲除导致CHIKV的拷贝数降低,而过度表达则增强了感染(Lasswitz et al 2022)。宿主因子TRIM21蛋白通过基质蛋白1(M1)的泛素依赖性降解来限制A型流感病毒(IAV)的复制(Lin et al 2023)。

而针对宿主的抗病毒药物也已逐步应用于临床。丙磺舒是支持IAV复制所需的宿主蛋白有机阴离子转运蛋白的抑制剂(Perwitasari et al 2013),它在临床上表现出了良好的抗病毒活性。临床上可用的宿主细胞胆固醇摄取受体(NPC1L1)对抗剂Ezetimibe通过影响病毒-细胞膜融合前的病毒胆固醇依赖步骤,在体外内抑制了所有主要丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)基因型的感染(Sainz et al 2012)。除此之外,还有多种靶向病毒所需的宿主因子的抑制剂等待临床开发。

2 目的与意义

冠状病毒在全球范围内的流行对动物与人类的健康造成了巨大的威胁。由于多种冠状病毒都具有变异快的特点,常导致原有疫苗保护力的降低及针对病毒靶点的药物耐药性的产生,给疫情防控带来了巨大的困难。冠状病毒感染宿主细胞后,会与宿主蛋白互作从而改变宿主基因的表达,为自身复制创造最佳微环境。因此,亟需挖掘在冠状病毒复制中发挥关键作用的宿主因子,以找到更保守的抗病毒靶点。

实验室前期利用猪全基因组CRISPR/Cas9敲除文库成功筛选到了多种TGEV复制必需的宿主因子,其中FUT8作为一个尚未被报道参与冠状病毒复制的新的宿主因子,在我们的筛选结果中被高度富集。通过病毒水平的验证,我们发现敲除FUT8可以显著降低TGEV的复制,但其作为一个核心岩藻糖基转移酶是如何调控TGEV复制的机制未知。本课题通过膜融合系统、病毒感染性克隆系统等分子病毒学方法结合结构生物学以探究并揭示其分子机制。研究结果有望进一步丰富冠状病毒与宿主互作网络,为研发高效精准的抗冠状病毒药物提供新的理论依据,并为抗病育种研究提供新的候选靶点。

3 材料与方法

3.1 实验材料

3.1.1 细胞、菌株、毒株

细胞：猪肾细胞系（Pig Kidney 15, PK-15）；猪肾小管上皮细胞（pig kidney proximal tubular, LLC-PK1）；猫肾细胞(feline kidney cell, CRFK)；人胚胎肾细胞（HEK-293T）；非洲绿猴肾细胞（Vero）及人肝癌细胞（Human Hepatocellular Carcinoma Cells, Huh7）、小鼠成纤维细胞系（Mouse Fibroblast, L929）保存于本实验室。

菌株：大肠杆菌 DH5 α 化学感受态细胞由本实验室保存。

毒株：TGEV WH-1 由何启盖老师馈赠，保存于本实验室；MHV A59，保存于本实验室；PDCoV CHN-HN-2014 由华中农业大学肖少波老师馈赠，FIPV-79-1146 毒株由本实验保存。HCoV-229E VR740 购自 ATCC，由本实验室保存。SARS-CoV-2 BA.1 毒株由中国科学院武汉病毒所保存，有关 SARS-CoV-2 活病毒实验均由武汉病毒所具有相关资质的人员在 P3 实验室中完成。

3.1.2 载体与其他质粒

sgRNA 慢病毒表达载体 Lenti-sgRNA-EGFP 由华中农业大学谢胜松老师馈赠（图 3-1A）。慢病毒包装辅助质粒 psPAX2（Addgene, #12260）和 pMD2.0G（Addgene, #12259）及慢病毒表达载体 pLVX-EF1 α -IRES-mcherry（图 3-1D）购自 Addgene，pcDNA3.1（图 3-1B）、TGEV-Bac（图 3-1E）由本实验保存。pcDNA3.1-OptiG-3xCFlag（图 3-1C）由华中农业大学赵凌老师馈赠。

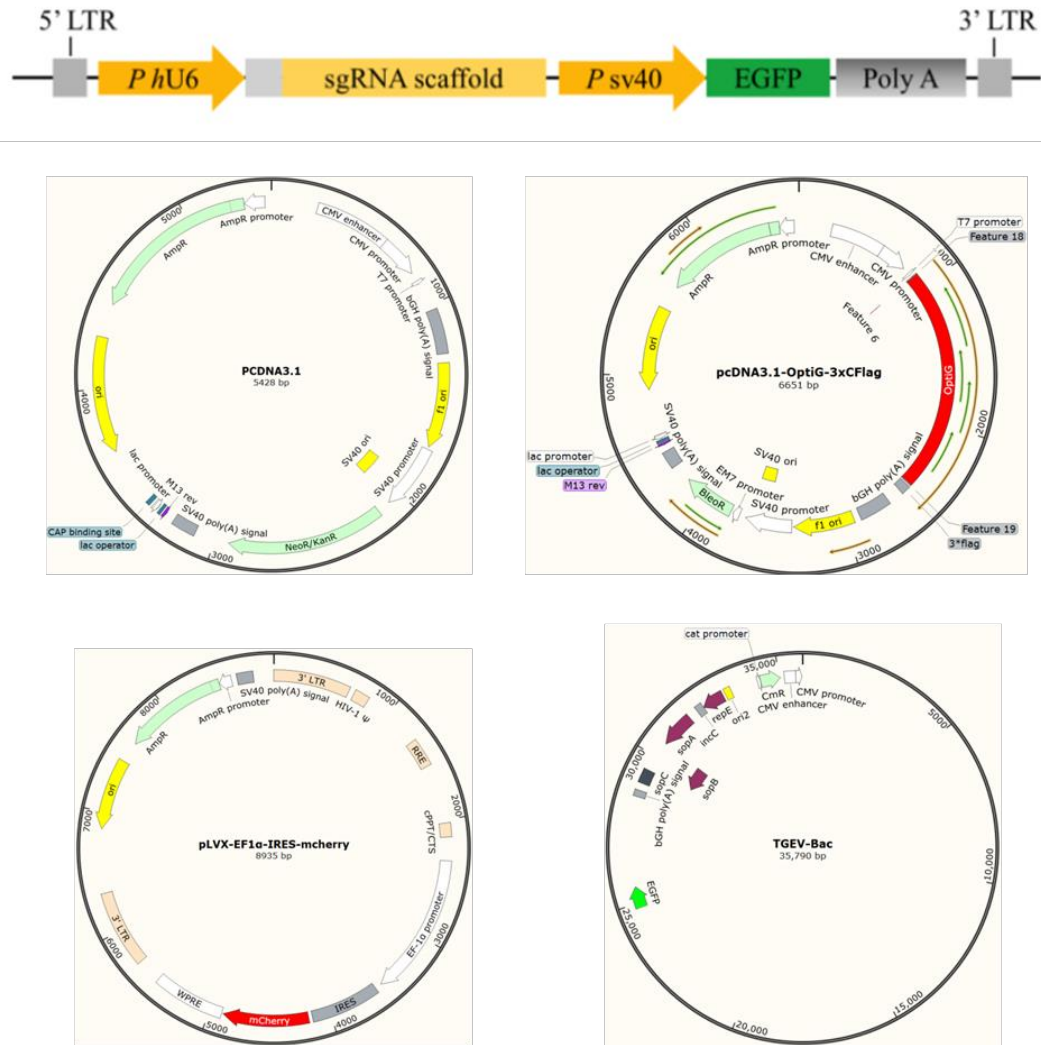


图 3-1 Lenti-sgRNA-EGFP、pcDNA3.1、pcDNA3.1-OptiG-3xFLAG、pLVX-EF1 α -IRES-mcherry 及 TGEV-Bac 质粒图谱

Fig. 3-1 plasmid maps of Lenti-sgRNA-EGFP、pcDNA3.1、pcDNA3.1-OptiG-3xFLAG、pLVX-EF1 α -IRES-mcherry and TGEV-Bac

3.1.3 主要试剂耗材

细胞培养相关试剂耗材：胰酶粉、转染试剂 jetPRIME[®]购自赛默飞世尔科技公司（Thermo）；293 培养基（无血清）购自永联生物科技（上海）有限公司；1.5 g/L 低糖培养基 DMEM、4.5g/L 高糖培养基 DMEM 购自 Gibco 公司；胎牛血清（FBS）购自武汉青木生物科技有限公司；青霉素-链霉素抗生素、ECL 化学发光显色液、RIPA 裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司（Beyotime）；蛋白 Marker、Alexa Fluor[®]488 anti-mouse IgG（H + L）抗体购自赛默飞公司；细胞培养板（96、48、24、12、6 孔

板), 离心管 (15 和 50 mL) 和细胞培养瓶 (T75 和 T25) 购自 NEST 公司; 10 mL 移液管和冻存管购自康宁公司 (Corning); 二甲基亚砜 (DMSO) 购自 Sigma 公司。慢病毒包装转染试剂 JetPRIME (PolyPlus, B180306) 购自 PolyPlus 公司; 慢病毒浓缩试剂购自博奥龙公司; 细胞体染料 (4',6-二脒基-2-苯基吲哚, DAPI) 购自碧云天公司。岩藻糖基化抑制剂 2F-peracetyl-fucose (2PF) 购自 MCE 公司。萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒购自翌圣公司。

工具酶、抗体及主要试剂 (1) 限制性内切酶: BbsI (NEB, #R3539S)、快切酶 NheI-HF、KpnI-HF、BamHI-HF、EcoRI-HF 均购自 NEB 公司。(2) 2×Phanta Max Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 2×MIX Taq 酶购自北京庄盟生物公司; Phanta 高保真 DNA 聚合酶 (Vazyme) 购自南京诺唯赞生物公司。(3) T4 DNA 连接酶 (NEB, M0202L) 购自 NEB 公司; DNA Marker (DL2000、DL5000 和 DL15000) 和高纯度低电渗琼脂糖购自武汉擎科创新生物科技有限公司; 核酸染料 Goldview 购自西安赫特生物科技有限公司。(4) DNA 提取和质粒提取试剂盒: 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN, DP304) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 去内毒素质粒小提中量试剂盒 E.Z.N.A.® Endo-Free Plasmid Mini Kit II (OMEGA, D6950-01) 购自美国 OMEGA 公司; 病毒基因组 RNA/DNA 提取试剂盒 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.5.0 (9766 Takara) 购自 TaKaRa 公司。(5) 回收和纯化试剂盒: PCR 产物胶回收纯化试剂盒 E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (OMEGA, D2500-02) 购自美国 OMEGA 公司。(6) LB 培养基和细菌抗生素: 胰蛋白胨 (Tryptone) (OXOID, LP0042) 和酵母提取物 (Yeast Extract) (OXOID, LP0021) 购自 OXOID 公司; 琼脂 (Agar) (Biosharp, BS027) 购自 Biosharp 公司; 氨苄霉素 (BioFroxx, 1146GR001) 购自广州赛国生物科技有限公司。(7) 抗体: 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠、羊抗兔 IgG 购自武汉博士德公司; FLAG 抗体购自 MBL 公司; 抗 TGEV N 蛋白兔源多克隆抗体由本实验制备并保存; Alexa Fluor594-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) (Thermo Fisher Scientific, #A-11005) 二抗购自赛默飞公司; (FUT8 抗体 FucT-VIII: sc-271244) 购自 SANTA CRUZ 公司; SARS-CoV-2-N 抗体 (SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein (HL344) Rabbit mAb #26369) 购自 CST 公司 (8) 其它试剂耗材: EP 管 (2 mL 和 1.5 mL) 和枪头 (黄、蓝和白) 购自武汉厚积生物有限公司; 柠檬酸钠、柠檬酸、二甲苯、无水乙醇、甲醇、冰醋酸、Tween-20、84 消毒液、医用酒精、三氯甲烷、异丙醇等购自国药试剂公司; DEPC

购自美国 Sigma 公司；ECL 化学发光显色液、RIPA 裂解液和嘌呤霉素购自碧云天公司；4%多聚甲醛购自武汉博士德公司；实时定量 PCR 试剂盒购自 Bio-RAD 公司；基因、引物合成和质粒序列分析由生工生物工程（上海）有限公司或南京金斯瑞生物科技有限公司完成。0.22 μm 滤器、0.45 μm 滤器、超滤管购自 Millipore 公司；PVDF 膜、30%丙烯酰胺、0.22 μm 滤纸购自伯乐公司；酶标板购自科前公司。

3.1.4 主要仪器设备

PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司；恒温水浴锅、核酸电泳仪等装备购自北京六一生物科技有限公司；SDS-PAGE 电泳仪、Western-blot 转膜仪、蛋白电泳槽和恒流恒压电泳仪、FPLC（Fast Protein Liquid Chromatogram）蛋白纯化仪、蛋白上样泵购自伯乐公司；全温震荡培养箱购自上海知楚仪器有限公司；普通离心机、低温高速离心机和各种型号移液器购自德国 Eppendorf 公司；低温冰箱购自海尔公司；电子天平购自梅特勒-托利多公司；旋涡震荡仪购自北京北信科仪分析仪器有限公司；真空抽气泵和搅拌器购自武汉厚积生物有限公司；流式细胞仪是美国 Becton Dickinson 公司产品；Nanodrop-2000 spectrophotometer 分光光度仪、倒置荧光显微镜、生物安全柜和恒温 CO₂ 培养箱是美国赛默飞公司产品；酶标仪 SpectraMax 190 是美国 Molecular Devices 公司产品；高速冷冻离心机购自 Hitachi 公司；化学发光成像系统 G: Box Chemi XT4 是英国 Syngene 公司产品；100kV 透射电镜是日本 HITACHI 公司产品；超净工作台购自 HDL 公司。

本文所使用的软件主要包括：NCBI BLAST 网站用于序列比对（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>）；SnapGene 用于制作质粒图谱；Primer Premier 5、GraphPad Prism、Adobe Illustrator CC 2017 和 Adobe Photoshop 用于制作和编辑实验结果图；sgRNACas9 用于设计 sgRNA 和脱靶评估；CRISPR-offinder 用于 sgRNA 文库的设计；Endnote 用于文献管理；UniProt 用于分析靶基因的特征与作用（<http://www.uniprot.org/>）；Microsoft office 用于实验数据的整理；Image J 用于实验图片的数据统计及分析。

3.1.5 常用缓冲液与试剂的配制

LB 液体培养基：量取 850 mL ddH₂O 于烧杯中，分别加入胰蛋白胨 10 g，酵母提取物 5 g，NaCl 10 g，搅拌溶解后定容至 1 L，灭菌后室温保存备用。

LB 固体培养基：量取 100 mL LB 液体培养基，加入 1-1.5 g 琼脂，灭菌完毕并降温后立即配置平板，或室温保存备用。

氨苄青霉素：量取 100 mL ddH₂O 于干净烧杯中，加入 10 g 氨苄青霉素粉末，搅拌溶解，在超净工作台中 0.22 μm 滤器过滤并分装，保存于-20 °C 备用。

氨苄固体 LB 平板：灭菌后的 LB 固体培养基冷却至 50 °C 左右，加入终浓度为 100 mg/L 的氨苄青霉素，混匀后倒入平皿中，每个约 10 mL，避免产生气泡，冷却后做好标记，4 °C 保存。

核酸电泳缓冲液（50×TAE）：向 400 mL 去离子水中加入 Tris base 121 g，EDTA Na₂·2H₂O 18.6 g，充分搅拌，加入 28.55 mL 醋酸，定容至 500 mL，室温保存备用。

1.5%琼脂糖凝胶：稀释 50×TAE 至 1×TAE（20 mL 50×TAE + 980 mL ddH₂O），量取 40 mL 1×TAE，加入 0.6 g 琼脂糖，微波溶解，冷却至 50 °C 左右，然后加入 3 μL Goldview 并混匀，倒入胶槽，并插上所需大小的梳子，待其冷却后使用。

PBS：量取 800 mL 去离子水于烧杯中，依次加入 NaCl 8 g，KCl 0.2 g，Na₂HPO₄ 1.42 g，KH₂PO₄ 0.27 g，搅拌至溶解，调节 pH 7.4，并定容至 1 L，随后用 0.22 μm 滤器过滤，室温保存备用。

PBST：于 PBS 中加入 0.05%的 Tween-20，混匀（1L PBS 中加入 500 μL Tween-20）。

TBST：量取 800 mL 去离子水于烧杯中，依次加入 NaCl 8 g，KCl 0.2 g，Tris base 3g，搅拌至溶解，调节 pH 7.4，并定容至 1 L，加入 500 μL Tween-20 混匀。

5×SDS-PAGE loading buffer：于 50 mL 离心管中，依次加入 pH 6.8 的 1 mol/L Tris-HCl 10 mL，SDS 4 g，溴酚蓝 0.2 g，甘油 20 mL，β-巯基乙醇 2 mL，加去离子水溶解后定容至 40 mL，分装后-20 °C 保存。

10%过硫酸铵（APS）：在 15 mL 离心管中，加 10 mL 去离子水，再加入 1 g 过硫酸铵，混匀分装后于-20 °C 保存。

10% SDS：在 15 mL 离心管中，加 10 mL 去离子水，再加入 1 g 过硫酸铵，混匀分装后室温保存。

1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)：于烧杯中加 800 mL 去离子水，称取 Tris base 181.7 g，搅拌至溶解，调节 pH 为 8.8，定容至 1 L，室温保存。

1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)：于烧杯中加 800 mL 去离子水，称取 Tris base 121.1 g，搅拌至溶解，调节 pH 为 6.8，定容至 1 L，室温保存。

5×SDS-PAGE 电泳缓冲液：于烧杯中加 800 mL 去离子水，称取 Tris 15.1 g，甘

氨酸 94 g, SDS 5 g, 充分搅拌溶解后定容至 1 L, 室温保存备用。

8% SDS-PAGE 分离胶 (15 mL): 在通风橱中, 依次向干净的烧杯中加入 ddH₂O 6.9 mL, 30 % 丙烯酰胺溶液 4.0 mL, 1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8) 3.8 mL, 10% SDS 0.15 mL, 10% APS 0.15 mL, TEMED 6 μ L。

12% SDS-PAGE 分离胶 (15 mL): 在通风橱中, 依次向干净的烧杯中加入 ddH₂O 4.9 mL, 30% 丙烯酰胺溶液 6.0 mL, 1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8) 3.8 mL, 10% SDS 0.15 mL, 10% APS 0.15 mL, TEMED 6 μ L。

5% SDS-PAGE 浓缩胶 (6 mL): 在通风橱中, 依次向干净的烧杯中加入 ddH₂O 4.1 mL, 30% 丙烯酰胺溶液 1 mL, 1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8) 0.75 mL, 10% SDS 0.06 mL, 10% APS 0.06 mL, TEMED 6 μ L, 迅速混匀。

转膜缓冲液: 于 700 mL 去离子水中依次加入甘氨酸 2.9 g, Tris 5.8 g, SDS 0.37 g, 搅拌至溶解, 然后加入甲醇 200 mL, 定容至 1 L, 室温保存。

封闭液: 量取 30 mL 的 TBST, 加入脱脂奶粉 1.5 g, 充分混匀, 直到没有颗粒状奶粉。

细胞生长液: 在 DMEM 培养基中加入 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素, 混匀 4 °C 保存备用。

细胞维持液: 在 DMEM 培养基中加入 2% FBS, 混匀 4 °C 保存备用。

0.25% 胰酶: 称取 NaCl 8 g, KCl 0.2 g, 二水柠檬酸三钠 1 g, 2H₂O·NaH₂PO₃ 0.056 g, NaHCO₃ 1 g, 葡萄糖 1 g, EDTA 0.2 g, 胰酶 2.5 g 溶于 1 L ddH₂O 中后, 在超净工作台中用 0.22 μ m 滤器过滤后, -20 °C 保存, 短期使用保存于 4 °C。

10 mg/mL 胰酶: 称取 1 g 胰酶, 加入 90 mL 水中, 充分混匀后定容至 100 mL 水中, 在超净工作台中使用 0.22 μ m 滤器过滤后, 每管 1 mL 分装后, 于 -20 °C 保存, 短期使用保存于 4 °C。

3.2 实验方法

3.2.1 构建 sgRNA 慢病毒载体质粒

3.2.1.1 sgRNA 设计

选取目的基因上最靠近起始密码子 ATG 的第一个外显子。利用 sgRNACas9 在线设计软件 CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) 搜寻特异性较高的 sgRNA 作为候选

sgRNA。本研究用到的不同靶基因 sgRNA 的序列见表 3-1

表 3-1 sgRNA 序列

Table 3-1 The sequences of sgRNA

基因名称	物种	引物名称	sgRNA 序列 (5' -3' -NGG)
Gene name	Species	Primer name	sgRNA sequence (5' -3' -NGG)
FUT8	猪 (Sus Scrofa)	F8-PIG-1	CAACGCCACGAACCAGTCCA
	人 (Homo sapiens)	F8-HUMAN-1	ATTGATCAGGGGCCAGCTAT
	非洲绿猴 (Chlorocebus sabaeus)	F8-MONKEY-5	ATAAAATAGCAAGGTCCCCC
	家鼠 (Mus musculus)	F8-MOUSE-4	TCCAAGATGAGTGTTTCGCT
	猫 (Felis catus)	F8-CAT-4	AATGAGCATAATCCAACGCC
FUT1	猪 (Sus Scrofa)	FUT1-KO	GCTTCACGACTGGATGTCCG
FUT2	猪 (Sus Scrofa)	FUT2-KO	TGGTGAAGATTCAACCCACG
FUT3	猪 (Sus Scrofa)	FUT3-KO	CCAGCTGACTGACAACCGCG
FUT4	猪 (Sus Scrofa)	FUT4-KO	CCGCCTGCTCACCGATCGCG
FUT5	猪 (Sus Scrofa)	FUT5-KO	CGGTCAGGGTGCGCTACTAC
FUT7	猪 (Sus Scrofa)	FUT7-KO	CGCTCGGAGCTTTCGTGTTT
FUT9	猪 (Sus Scrofa)	FUT9-KO	CTGAAGATCCAGCTGTTGGT
FUT10	猪 (Sus Scrofa)	FUT10-KO	GCAGCATGGTTCGGATACGG
FUT11	猪 (Sus Scrofa)	FUT11-KO	GAGCGCATCGAGTGCGCGCG
FUT12	猪 (Sus Scrofa)	FUT12-KO	CAGTAGAGCAGATAACCGGC
FUT13	猪 (Sus Scrofa)	FUT13-KO	GTCGGCAGCCGACATCTTGT

3.2.1.2 寡核苷酸序列的合成

(1) 根据目标载体骨架和酶切位点确定 sgRNA 序列的粘性末端碱基。

(2) 本研究使用的慢病毒载体质粒 lenti-sgRNA-EGFP 带有 BbsI 酶切位点，用相应的限制性内切酶线性化载体后会生成粘性末端。因此，需要合成带有互补配对粘性末端的寡核苷酸序列，即在 20bp sgRNA 序列 5'前添加 cacc，形成 cacc + 20bp 的 Forward 序列；在 20bp sgRNA 序列进行反向互补后并在 5'添加 aaac,形成 cacc + 20bp 的 Reverse 序列。

(3) 合成 sgRNA 寡核苷酸序列，浓度为 100 μ M。

3.2.1.3 慢病毒载体酶切

慢病毒载体 lenti-sgRNA-EGFP 使用 BbsI 酶切位点酶切，酶切体系见下表。

表 3-2 单酶切体系

Table 3-2 single digestion system

成分	含量
lenti-sgRNA-EGFP 质粒	1 μ g
10 $\times$ CutSmart® buffer	5 μ L
BbsI-HF®内切酶(20 units)	1 μ L
ddH ₂ O	Up to 50 μ L

反应条件为 37 °C 酶切 15 min, 85°C 灭活 5 s。

3.2.1.4 慢病毒线性化载体核酸凝胶电泳回收

提前 30 min 配置好浓度 1%的琼脂糖凝胶, 待酶切反应结束后, 于反应体系中加入约 1/10 体积的 10 $\times$ loading buffer 并混匀。小心取出凝固的琼脂糖凝胶, 放入装有 TAE 电泳液的核酸电泳仪中。将反应产物依次加入凝胶孔中, 同时设置一孔加入合适的 DNA marker, 在电压 130 V 下进行电泳。依据目的条带的预期大小, 选择合适的电泳时间, 保证条带区分明显。电泳结束后, 小心取出凝胶, 在紫外凝胶系统下观察并拍照, 注意防护紫外辐射。

3.2.1.5 胶回收

(1) 需要回收 DNA 凝胶电泳产物时, 在凝胶成像系统下切下含有所需目的大小条带的凝胶; 切胶时间能短则短, 避免紫外照射造成 DNA 片段突变, 同时尽可能小的切下凝胶且包含完整的目的条带。

(2) 切取凝胶, 放入干净的 2 mL EP 管中, 加入刚好没过凝胶体积的 Binding Buffer, 56°C 水浴约 10 min, 每 3-5 min 将 EP 管颠倒混匀, 直至所有凝胶溶解。

(3) 冷却后的样品溶液, 转移到 Spin Column 内, 10000 rpm 离心 1 min, 弃去收集管中废液。

(4) 向 Spin Column 中再次加入 500 μ L Binding Buffer, 10000 rpm 离心 1 min, 弃去收集管中废液。

(5) 向 Spin Column 中加入 700 μ L 的 Wash Buffer (Wash Buffer 使用前需按说明加入相应体积的无水乙醇并混匀), 室温静置 2 min, 10000 rpm 离心 1 min, 弃去收集管中废液。重复步骤 5。

(6) 12000 rpm 离心 2 min, 将 Spin Column 转移到新的 1.5 mL EP 管中, 室温静置

8 min，可选择置于打开风机的超净工作台中。

（7）向 Spin Column 中加入 40 μL 的 Elution Buffer，室温静置 1 min，12000 rpm 离心 2 min。测定回收产物浓度，做好标记。

3.2.1.6 sgRNA 双链退火

各取 5 μL 的 100 μM 寡核苷酸，混匀。具体反应体系如下：sgRNA 上游引物：5 μL 、sgRNA 下游引物：5 μL 。涡旋震荡混匀，离心，放入沸水中，自然冷却至常温；将退火配对后的 sgRNA 碱基用超纯水按 1:100 稀释。

3.2.1.7 连接

将 sgRNA 寡核苷酸链连接到 lenti-sgRNA-EGFP 载体上。反应体系如下：

表 3-3 连接体系

Table 3-3 Ligase reaction

成分	含量
线性化的 lenti-sgRNA-EGFP 质粒	10 ng
sgRNA 寡核苷酸退火产物	1 μL
2 $\times$ T4 DNA Ligase Buffer	5 μL
T4 DNA Ligase	1 μL
ddH ₂ O	Up to 10 μL

反应条件为 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接或室温连接 2 h。

3.2.2 大肠杆菌感受态细胞的制备（氯化钙法）

（1）将-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存的 DH5 α 或 DH10Bac 菌种划线接种于 LB 固体培养基平板上，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱培养 12-16 h 或 48 h 后挑取单菌落接种于 5 mL LB 液体培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床震荡培养 8-10 h。

（2）将活化后的菌液按 1:100 的比例接种到 50 mL 的 LB 液体培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床震荡培养 2-3 h，使其 OD_{600 nm} 值达到 0.5-0.6。将菌液转移到无菌的 50 mL 离心管中，冰上放置 30 min。

（3）4 $^{\circ}\text{C}$ 4000 rpm 离心 10 min，于无菌超净台中弃尽上清。加入 10 mL 冰预冷的 0.1 mol/L 的 CaCl₂ 重悬沉淀，冰上放置 30 min。

（4）4 $^{\circ}\text{C}$ 4000 rpm 离心 10 min，于无菌超净台中弃尽上清。加入 2 mL 冰预冷的 0.1

mol/L 的 CaCl_2 及终浓度为 15% 的无菌甘油，重悬沉淀。分装 100 μL /管，液氮速冻， $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

3.2.3 连接产物的转化

- (1) 从冰库 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 中拿出感受态 (DH5 α) 细胞，置于冰上融化。
- (2) 将连接产物 (10 μL) 全部加入 DH5 α 细胞中，充分混合后冰浴 30 min。
- (3) $42\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴锅中热激 1 min30 s，速置于冰上 3 min。
- (4) 加入 450 μL 无抗的液体 LB 培养基，置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 摇床中培养 1 h。
- (5) 3000 rpm 离心 5 min。吸弃部分上清，细胞重悬，用酒精灯烧灼后冷却的金属棒将菌液均匀涂布于含 Amp 的固体琼脂平板上。
- (6) 平板倒置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 14 h。

3.2.4 挑取单克隆菌落及菌液 PCR

- (1) 超净工作台中，镊子夹取灭菌白枪头从培养皿中挑取 5-8 个中等菌落，分别加至 1 mL 含 Amp 的液体 LB 培养基中。
- (2) $37\text{ }^\circ\text{C}$ 摇床 220 rpm 摇菌 6 h。
- (3) 肉眼可见培养基变浑浊，在超净工作台中取菌液进行菌液 PCR 鉴定，剩余菌液暂存于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 。

菌液 PCR 体系如下：

表 3-4 菌液 PCR 体系

Table 3-4 Bacterial liquid PCR system

试剂	体积 (μL)
菌液	1
2 $\times$ F5 Taq PCR MasterMix	5
F(10 μM)	0.5
R(10 μM)	0.5
ddH ₂ O	3

反应条件： $98\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 3 min； $98\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 15 s， $55\text{ }^\circ\text{C}$ 退火 15 s， $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 15 s，35 个循环； $72\text{ }^\circ\text{C}$ 彻底延伸 3 min。菌液 PCR 完毕后，进行琼脂糖凝胶电泳分析，选

取 2-3 个鉴定正确的菌液送合测基因测序。随后根据测序结果，复苏其中一支阳性菌液。取 300 μL 菌液加入 100 mL 含 Amp 的液体 LB 培养基中。37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 16 h。

3.2.5 去内毒素小提质粒

- (1) 将菌液转移至 50 mL 离心管，5000 rpm 10 min 集菌。
- (2) 弃上清，加入 500 μL solutionI，震荡仪重悬细菌沉淀。
- (3) 将悬液转移至新的 2 mL EP 管中，加入 500 μL solutionII，充分颠倒混匀 10 次，避免剧震，得到清亮的裂解液，室温静置 2 min。
- (4) 加入 250 μL 预冷的 Buffer N3，温和地充分颠倒数次，直至产生白色絮状沉淀。4 $^{\circ}\text{C}$ ，12000 rpm 离心 10 min。
- (5) 转移上清至 1.5 mL EP 管中，加入 0.1 倍体积的 ETR 溶液，混匀数次，溶液变浑浊。冰上孵育 10 min，过程中颠倒混匀溶液几次，最终液体变清亮。
- (6) 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅水浴 5 min，颠倒混匀，离心机 12000 rpm，5 min。
- (7) 转移上清至 2 mL EP 管中，加入 0.5 倍体积的无水乙醇，颠倒混匀，室温静置 2 min。
- (8) 转移液体至 DNA 吸附柱中，离心机 10000 rpm 离心 1 min，倒废液。
- (9) 向 DNA 吸附柱中加入 500 μL HBC Buffer，静置 2 min，离心机 10000 rpm 离心 1 min，倒废液。
- (10) 向 DNA 吸附柱中加入 700 μL DNA Wash Buffer，静置 2 min，离心机 10000 rpm 离心 1 min，倒废液，重复步骤 10。
- (11) 离心机 10000 rpm 空甩 3 min，晾干乙醇 8 min。
- (12) 将 DNA 吸附柱放入新的 EP 管中，做好标记，加入 80 μL Endo-Free Elution Buffer，室温静置 2 min，离心机 12000 rpm 离心 2 min。
- (13) 将下液吸取再次加入 DNA 吸附柱，12000 rpm 离心 2 min。分光光度计测浓度，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3.2.6 细胞复苏及冻存

3.2.6.1 细胞复苏

- (1) 在水浴锅中预热 10% FBS DMEM 培养基；
- (2) 从液氮罐中取一支冻存的细胞，迅速放于的 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中融化；

(3) 细胞融化后, 室温 1200 rpm 离心 5 min, 弃去上清, 加入 1 mL 的 10% FBS DMEM 培养基;

(4) 将重悬好的细胞加入 T25 细胞培养瓶中, 补加 4 mL 10% FBS 的 DMEM 培养基。做好标记, 摇匀后放置于含有 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养。

3.2.6.2 细胞冻存

(1) 按照胎牛血清: DMEM: DMSO=7:2:1 的比例配置冻存液。

(2) 用胰蛋白酶把 T25 中的细胞消化下来, 转移至 2 mL EP 管中。

(3) 离心机离心 1200 rpm, 5 min, 弃去所有上清。加入配制的冻存液, 轻柔吹打重悬细胞。

(4) 将细胞转移至冻存管中, 每管 1.2-1.5 mL。将有关信息在冻存管顶部和侧壁标注清楚。

(5) 将冻存管放入加有异丙醇的细胞冻存盒中 (放入前擦净冻存盒内壁), 放入 -80 °C 冰箱, 24 h 后取出冻存于液氮罐中。

3.2.7 慢病毒包装

(1) 取新复苏的 HEK293T 细胞, 培养 2 代左右进行转染。在转染前一天将细胞接种至 T75 细胞培养瓶。

(2) 待细胞达到 80% 密度时进行转染。转染前弃除旧培养基, PBS 冲洗一遍, 加入 15 mL 新鲜 2% FBS DMEM 培养基 (无抗生素), 置于培养箱中继续培养。

(3) 转染体系见下表

表 3-5 三质粒慢病毒包装体系

Table 3-5 Three-plasmid lentiviral packaging system

成分	含量
Vector	12 µg
psPAX2	8 µg
pMD2.G	4 µg
jetPRIME reagent	48 µL
jetPRIME buffer	500 µL

以上成分震荡混匀, 室温静置 10 min, 轻缓加入细胞培养基中, 轻轻摇匀。

- (4) 转染后 8-10 h, 弃去上清, 轻缓加入含有 1% 双抗, 2% FBS 的 DMEM 培养基, 混匀继续培养。
- (5) 60 h 后收集全部上清液至 50 mL 离心管中, 保存于 4 °C, 重新加入含有 1% 双抗, 2% FBS 的 DMEM 培养基, 继续培养。
- (6) 84 h 后收集全部上清液至 50 mL 离心管中, 3,000 rpm, 4 °C 离心 10 min。(7) 离心后, 细胞碎片被离心到管底, 将上清液用 0.45 μm 滤器过滤。
- (8) 过滤后的上清液按照 4:1 的比例加入慢病毒浓缩试剂, 30 min 震荡混匀一次, 共三次。4 °C 过夜静置。
- (9) 4 °C 过夜静置后底部有白色沉淀, 继续 5000 rpm, 4 °C 离心 30 min。
- (10) 离心结束, 倒尽上清液, 用吸水纸吸干残液。病毒浓缩在管底, 每管加入 200 μL 预冷的 DMEM 培养基重悬病毒。
- (11) 每管分装 50 μL , 分装后置于 -80 °C 保存。

3.2.8 筛选阳性单克隆细胞系

3.2.8.1 慢病毒感染 Cas9 细胞系

- (1) 将 PK-Cas9 细胞铺入 6 孔板中, 待其密度达 30% 后每孔加入 50 μL 慢病毒液, 十字交叉法摇匀培养液。37 °C, 5% CO_2 培养 12 h。
- (2) 将原液换为 10% 高糖 DMEM 培养液, 37 °C, 5% CO_2 培养 36 h。
- (3) 通过荧光显微镜观察法测定慢病毒包装效果。将 6 孔板中细胞消化后转移至 T25 培养瓶中培养。

3.2.8.2 挑取单克隆细胞系

- (1) 将包装好的细胞消化吹散至单个后, 用白枪头吸取 6 μL 细胞液转移至细胞专用培养皿中, 加入 15% 高糖 DMEM 培养基。5 d 后, 准备挑取单克隆。
- (2) 将培养皿置于荧光显微镜下观察单克隆细胞团位置, 挑选荧光亮的细胞, 将其位置用记号笔准确标记。高糖 DMEM 培养液清洗 2 次。
- (3) 在 48 孔板中加入 200 μL 20% 高糖 DMEM 培养基, 显微镜下用灭菌黄枪头刮下标记好的单克隆, 移至 48 孔板中。37 °C, 5% CO_2 培养。

3.2.9 Sanger 测序检验单克隆细胞系基因敲除效率

3.2.9.1 提取细胞基因组

- (1) 待 48 孔板中细胞长满后传至 12 孔板, 12 孔板中细胞取一半提基因组。
- (2) 细胞悬液 2000 rpm 离心 3 min, 弃去上清, 加入 200 μ l buffer GA。震荡混匀至细胞彻底悬浮。
- (3) 加入 20 μ l proteinase K, 混匀。加入 200 μ l buffer GB, 充分颠倒混匀, 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 溶液变清亮。加入 200 μ l 无水乙醇, 充分震荡混匀 15 s。
- (4) CB3 吸附柱放入收集管中, 将上一步溶液和沉淀全部转移至 CB3 吸附柱中。1000 rpm 离心 30 s, 弃下液。
- (5) 向吸附柱中加入 500 μ l buffer GD, 10000 rpm 离心 30 s, 弃下液。
- (6) 加入 600 μ l 漂洗液 PW, 10000 rpm 离心 30 s, 弃下液。重复一次。
- (7) 空甩 12000 rpm 2 min, 弃废液。吸附柱放入新的 1.5 mL EP 管, 温箱晾干 8 min。
- (8) 靠近吸附柱膜中央但不要碰到膜, 加入 50 μ l 洗脱液 TE, 静置 2 min, 12000 rpm 离心 2 min, 将下液重新加入重复一次。洗脱缓冲液 TE 作空白检测, 分光光度计测浓度。

3.2.9.2 Sanger 测序

在被敲除基因的基因组上距 sgRNA 上下游 100 bp 以上的位置各设计一段上(下)游引物 (表 3-5), PCR 扩增 (表 3-6), 胶回收后送合测基因公司测序。

表 3-6 Sanger 测序引物序列

Table 3-6 The sequences of sanger sequencing primers

基因名称	物种	引物名称	引物序列
Gene name	Species	Primer name	sequences of primers
FUT8	猪 (Sus Scrofa)	F8-PIG-1-F	GCCTGTTGGCCAGTCAATAC
		F8-PIG-1-R	ATGAAGCCCTGGCACCTAAAA
	人 (Homo sapiens)	F8-HUMAN-1-F	ACTGATCATGGTACTCTGGGGA
		F8-HUMAN-1-R	ACCTCAGGTACTCTTCGCCT
	非洲绿猴 (Chlorocebus sabaeus)	F8-MONKEY-F	CCACAGCATGTAGAGTCCATG
		F8-MONKEY-R	GGCCCATGGGCTGTGAGTTG
	家鼠 (Mus musculus)	F8-MOUSE-F	TGCCAGTCCTTATGATGAATC
		F8-MOUSE-R	CCCCAGACCTGCAAAGAATAG
	猫 (Felis catus)	F8-CAT-F	TGCCAGTCAACACCAGAGTG
		F8-CAT-R	TCGATGAATGAAGCCCTGAA
FUT1	猪 (Sus Scrofa)	FUT1-KO-F	CGTGGTATCATCTCCCGTGG
		FUT1-KO-R	CATCGCCAGCAAAGATCACG
FUT2	猪 (Sus Scrofa)	FUT2-KO-F	GTTTCCACGCACCCACAAAG

FUT3	猪 (Sus Scrofa)	FUT2-KO-R	AGGTGGTGGTAGAAGGTCCA
		FUT3-KO-F	CAGGACTCGTGAAGATTGAC
		FUT3-KO-R	TCAGGTTGAAGTACCCGTCCA
FUT4	猪 (Sus Scrofa)	FUT4-KO-F	GGACCCGTGGAGCTTTAGAT
		FUT4-KO-R	GCTAGGATGGGTCCTAGGGT
FUT5	猪 (Sus Scrofa)	FUT5-KO-F	GCAGCCCAAGAAATGGCAA
		FUT5-KO-R	GTTGAAGTACCCGTCCAGGG
FUT7	猪 (Sus Scrofa)	FUT7-KO-F	AGATGAAAGGAGAGCGGTGC
		FUT7-KO-R	GCCATAGGGCACGAAGATGT
FUT9	猪 (Sus Scrofa)	FUT9-KO-F	TGGTGATGGCAGTCTTTGTCA
		FUT9-KO-R	GGGGTGTGTGAGTTGGTGAT
FUT10	猪 (Sus Scrofa)	FUT10-KO-F	AGATCTGCTCTGATGGGCTC
		FUT10-KO-R	ACCTGACACACCCACTCACTA
FUT11	猪 (Sus Scrofa)	FUT11-KO-F	GAGCGCATCGAGTGCGCGCG
		FUT11-KO-R	CAACGGGTAGTCCGAGTGAC
FUT12	猪 (Sus Scrofa)	FUT12-KO-F	CGTGGGCATCGTCGC
		FUT12-KO-R	GGAGCGTTGCATCAGTGAC
FUT13	猪 (Sus Scrofa)	FUT13-KO-F	CGGTCGCCGGAAGTGTG
		FUT13-KO-R	ACCATCTCTACACCCCGCAT

表 3-7 PCR 扩增体系

Table 3-7 Amplification system of PCR

试剂	体积 (μL)
模板 DNA	2
上游引物 F(10 μM)	2
下游引物 R(10 μM)	2
2×Phanta Max Master Mix	25
ddH ₂ O	up to 50

反应条件为：95 °C预变性 3 min；95 °C变性 15 s，58 °C退火 15 s，72 °C延伸 15 s 到 2 min，40 个循环；72 °C彻底延伸 5 min；16 °C冷却。4 °C低温保存。

3.2.10 Western Blot 检验单克隆细胞系基因敲除效率

(1) 配制凝胶

表 3-8 SDS-PAGE 分离胶配方(10%)

Table 3-8 SDS-PAGE separating Gel Formulation(10%)

成分	体积 (mL)
H ₂ O	5.9
30%Acrylamide	5.0
1.5M Tris-Hcl (pH8.8)	3.8
10%SDS	0.15
10%过硫酸铵	0.15
TEMED	0.006

表 3-9 SDS-PAGE 浓缩胶配方

Table 3-9 SDS-PAGE stacking gel formulations

成分	体积 (mL)
H ₂ O	3.4
30%Acrylamide	0.83
1.0M Tris-Hcl (pH6.8)	0.63
10%SDS	0.05
10%过硫酸铵	0.05
TEMED	0.005

(2) 跑胶前样品处理

a.弃去培养基，胰蛋白酶消化细胞收集至 EP 管中。离心机低速离心沉淀细胞，去上清，加入 80 μ L WB 裂解液重悬细胞沉淀。

b.4 $^{\circ}$ C 冷库转盘旋转 30 min，充分裂解。

c.离心机 4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心 15 min。取上清，每管加入 20 μ L 5 $\times$ loading buffer。

d.沸水煮 10 min，冰浴 5 min 防止复性。

(3) SDS-PAGE: 5000 rpm 离心 3 min，每孔点样 20 μ L，蛋白 Marker 点 7 μ L。80 V 电泳 30 min，120 V 电泳 60 min。

(4) 转膜: 120 V 湿法转印至 PVDF 膜，120 V 转膜 40 min。转膜缓冲液: 80 mL 10 $\times$ 转膜缓冲液+720 mL 水+200 mL 甲醇。将滤纸两片放入装有转膜缓冲液的盒子中。切去浓缩胶，根据胶的大小剪硝酸纤维素膜。放入装有甲醇的盒子中。激活 2 min。

打冰盒，中间挖洞放水，冰水混合物。黑色底上放滤纸、胶、膜、滤纸。用滚轮赶走气泡，夹紧。放入电泳槽中，黑色面对黑色面，如果只转一个膜，放在有电极的一侧，胶槽中放冰袋。连接正负极，电压 120 V，根据蛋白大小设定转膜时间，1 KDa/min。

(5) 封闭：1 g 脱脂奶粉溶于 20 mL TBST 溶液配置成封闭液。PVDF 膜放入封闭液中，4 °C 摇床过夜封闭。

(6) TBST 洗两遍，室温孵育一抗（GAPDH: TBST=1:3000; FUT8 antibody: TBST=1:300）3.5 h。TBST 洗三遍，每次 5 min。

(7) 室温孵育二抗（羊抗鼠 HRP: TBST=1:3000）1.5 h。TBST 洗三遍，每次 5 min。

(8) 显色液 A、B 液各取 500 μ L，混匀。均匀滴加显色液，显色，化学发光成像系统拍照，保存。

3.2.11 MTS 法检测单克隆细胞活力

(1) 在一个 96 孔板中接种细胞，单克隆细胞和 PK-Cas9 细胞各 12 个重复，每孔加入 100 μ L 10%高糖 DMEM 细胞培养基。调整各孔细胞密度至一致，每孔中细胞约 6000 个。

(2) 将 96 孔板放置于 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱中，培养至细胞密度为 80% -90%。

(3) 室温静置 2 h 融化 MTS 溶液。避光，弃去细胞培养液，每孔中加入 10 μ L MTS 溶液和 100 μ L 2%高糖 DMEM 细胞培养基；37 °C，5% CO₂ 避光培养 3 h。

(4) 设置检测波长为单波长，490 nm。检测各孔 OD 值。

3.2.12 间接免疫荧光实验(IFA)

(1) 固定：TGEV 感染 24 h 后，收集 24 孔板中细胞上清（-20 °C 保存），每孔轻缓加入 500 μ L 4%多聚甲醛，室温静置 30 min。PBS 摇洗一次。

(2) 通透：每孔加入 300 μ L 0.3% Triton X-100（PBS 溶液配制），室温静置 10 min。PBS 摇洗一次。

(3) 封闭：每孔加入 300 μ L 2%BSA 溶液，37 °C 孵育 30 min。

(4) 孵育一抗：拍掉封闭液，每孔直接加入 300 μ L 一抗（TGEV-N 多抗：PBS=1:1000 配制），37 °C 孵育 1-1.5 h。PBS 震荡洗三次，每次 5 min。

(5) 孵育二抗：避光，每孔加入 300 μ L 二抗（羊抗兔 594：PBS=1:1000 配制），

37 °C 孵育 45 min。PBS 震荡洗三次，每次 5 min。

(6) DAPI 染色：每孔加入 300 μ L DAPI (DAPI: PBS=1:1000 配制)，染色 1 min。PBS 震荡洗三次，每次 5 min。每孔加入 500 μ L PBS，荧光显微镜下观察荧光。

3.2.13 病毒滴度(TCID₅₀)的测定

(1) 将实验组细胞 (FUT8-KO) 和对照组细胞 (PK-Cas9) 接种于 24 孔板中，每孔细胞密度达 70%-80% 时加入不同 MOI TGEV 病毒。12 h, 24 h, 36 h, 48 h 收集上清液 (病毒样品)。冻存于 -20 °C 冰箱中。

(2) 将细胞接种于 96 孔板中。置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养至细胞密度 70%。

(3) 准备 2 mL EP 管，将病毒原液用 2% DMEM 培养液做 10 倍倍比稀释，病毒原液及稀释液震荡混匀。每组病毒液设置 -3 至 -8 共 6 个浓度梯度，每个浓度梯度设置 8 个重复孔。每孔加入 100 μ L 的病毒液。于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 3 d 后在显微镜下观察病变情况。

(4) Reed-Muench 法计算病毒滴度：LogTCID₅₀ = 高于 50% 病变的病毒最高稀释度的对数 + 距离比例。

3.2.14 病毒扩增实验

待细胞长满单层后，取出细胞，于超净工作台中用灭菌 PBS 将细胞清洗两遍，更换 2% 血清 DMEM 培养基，然后以适量 MOI 病毒感染细胞。病毒感染 48 h，观察细胞病变后，取出细胞于 -80 °C 冰箱反复冻融一到三次，8000 rpm 离心 10 min 去除细胞碎片，将病毒上清混匀后分装保存于 -80 °C 备用。

3.2.15 Western Blot 实验验证 TGEV 复制情况

接种状态良好的 FUT8-KO 细胞于 24 孔板中，同时设置 PK-Cas9 对照组。待细胞密度达到 70% 时，将细胞培养液换成 2% 高糖 DMEM 培养液。每孔加入 0.01 MOI TGEV 病毒液，置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 时收集细胞加入细胞裂解液，进行 Western Blot 样品处理。全部样品处理完后进行 Western Blot 实验。

3.2.16 RNA 提取及反转录

用 Trizol 法提取总 RNA，具体步骤如下：

- (1) 待测样品加入 1 mL Trizol 裂解液并震荡摇匀，室温静置 5 min。
- (2) 用无 RNA 酶枪头加入 200 μ L 氯仿，涡旋震荡 2 min，置于冰上 10 min，4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心 15 min。
- (3) 取上清 500-600 μ L 于另一个无 RNA 酶的 1.5 mL EP 管中，再加入等体积的异丙醇，轻轻的上下颠倒混匀，冰上静置 10 min，4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心 10 min。
- (4) 离心完后侧壁底部可见白色沉淀，轻轻弃掉上清残液，再加入 1 mL 75%乙醇洗涤沉淀，轻弹沉淀，4 $^{\circ}$ C，10000 rpm 离心 7 min。
- (5) 轻轻弃掉上清，将 EP 管再次 4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心 5 min，用 10 μ L 移液器吸弃管壁残余液体。
- (6) 将 EP 管置于超净台中静置自然干燥 5 min。
- (7) 往 EP 管中加入 20 μ L DEPC 水溶解管内白色的 RNA 沉淀，震荡充分，瞬离，测量浓度。

反转录：需要计算病毒拷贝数的样品反转前定量至 100 ng/ μ L，计算基因拷贝数样品需要提取去除基因组，使用诺唯赞公司的 RNA 反转录酶试剂盒进行反转，体系如下：

表 3-10 基因组 DNA 去除

Table 3-10 Genome DNA wiper system

试剂	体积 (μ L)
模版 RNA	8
4 $\times$ gDNA wiper Mix	4
RNase-free ddH ₂ O	4

用移液器轻轻吹打混匀。42 $^{\circ}$ C 2 min。

在反应管中直接加入 4 μ L 5 $\times$ HiScript III qRT SuperMix。反应条件为：37 $^{\circ}$ C 15 min，85 $^{\circ}$ C 5 s。

3.2.17 荧光定量 PCR

本研究中使用的荧光定量 PCR 方法包括相对定量法和绝对定量法，具体步骤如下：

相对定量法（本研究使用的实时荧光定量 PCR 引物序列见表 3-9）：

表 3-11 实时荧光定量 PCR 反应体系

Table 3-11 Real-time Fluorescent Quantitation PCR system

成分	体积 (μL)
2×SYBR Green Mix	5
引物-F(10 μM)	0.5
引物-R(10 μM)	0.5
模板 cDNA(100ng/μL)	1
RNase-free ddH ₂ O	Up to 10 μL

反应条件为：95 °C预变性 5 min；95 °C变性 10 s，60 °C退火 10 s，72 °C延伸 15 s，40 个循环；72 °C彻底延伸 2 min。

数据处理方法为 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法(Livak 法)：

- (1) 计算每组内参基因 sgAction CT 均值。
- (2) 计算第一个 ΔCT ，即每组的待检目的基因减去内参基因的 CT 值。
- (3) 计算对照组中 ΔCT 的均值，再用实验组的每一个 ΔCT 减去刚刚计算的对照组的 ΔCT 均值，得到 $\Delta\Delta CT$ 。
- (4) 相对表达量计算，也就是实验组相对于对照组: $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。

绝对定量法：

- (1) PCR 扩增 TGEV WH-1 的 N 基因，克隆至 pCDNA3.1 载体上，测序鉴定正确后提取质粒，测定浓度，计算出拷贝数。将质粒连续做 10 倍的倍比稀释，作为标准品，用于制作标准曲线。
- (2) 反应体系与条件和相对定量法相同进行数据分析，一般最终用于做图需要有 5 个数据点。计算出 R^2 值和扩增效率、标准曲线， R^2 需要至少 0.99 以上。
- (3) 将仪器检测得到的 CT 值代入标准曲线中，得到拷贝数。

表 3-12 荧光定量 PCR 引物

Table 3-12 The primers for Fluorescent Quantitation PCR

引物名称	引物序列（5' -3' ）
猪源 β -actin-QPCR-F	CGGGACCTGACCGACTACCT
猪源 β -actin-QPCR-R	GGCCGTGATCTCCTTCTGC
TGEV-N-F	GAGTTGTCTGGGTTGCCAAG
TGEV-N-R	TGAATTGTTGCCTGCCTCTA
FUT8-QPCR-F-1	CTGGACATTGGTCAGGTGAAGT
FUT8-QPCR-R-1	CAGGATCACCATGGACTCGT
pAPN-qPCR-F	TGTTTGACCCACAGTCCT
pAPN-qPCR-R	TCCACATAGGAGGCAAAG

3.2.18 透射电镜样品制备

- （1）培养好的细胞弃培养基，PBS 洗两遍，加入胰酶。
- （2）胰酶消化好后(时间不宜过长)，用培养基终止消化，用吸管把细胞吹下来。吸入离心管，离心 2000 rpm，3 min，细胞团要有绿豆大小。
- （3）弃上清加入 2.5%的常温戊二醛固定液，把细胞团轻轻挑起悬浮于固定液中。室温避光固定 30 min，再转移至 4 ℃保存，冰袋运输，在保存和运输过程中固定液切勿冻结冰。送赛维尔公司制作电镜样品。

3.2.19 双酶切及同源重组

- （1）双酶切体系如下：

表 3-13 双酶切体系

Table 3-13 Double digestion system

成分	体积（ μ L）
载体	2
限制性内切酶 1(20 units)	1
限制性内切酶 2(20 units)	1
rCutSmart™ Buffer	5.0
ddH ₂ O	Up to 50

PCR 仪中：37 °C 15 min。酶切产物胶回收。

(2) 目的基因与酶切载体同源重组体系如下；

表 3-14 重组反应体系

Table 3-14 Ligation reaction system

试剂	体积 (μL)
目的基因	2
载体	1
Exnase ® II	1
5×CE II Buffer	2
ddH ₂ O	up to 10

PCR 仪中：37 °C 30 min。

3.2.20 TGEV-BAC 质粒提取

(1) 摇菌：配制含 1:2000 的氯霉素 (34 mg/mL) 的 300 mL 液体 LB 培养基，加入 200 μLBAC 菌液，37 °C 过夜摇菌。

(2) 集菌：室温 5000 r/min 离心 10 min，弃上清，离心管倒扣于纸上，倒干菌液。

(3) 重悬：用 9 mL solution I 重悬沉淀 (沉淀过多，则可适当多加点 solution I，如 12 mL)，后面 solution II/III 按比例添加即可，可都在大离心管中进行，200 μL 菌液最后集中在一个管子里。

(4) 加入 9 mL solution II，颠倒混匀，静置 3-5 min；加入 12 mL solution III，颠倒混匀，静置 1-3 min。

(5) 室温 10000 rpm 离心 20 min，初步去除沉淀。

(6) 取上清，加入 0.7 倍体积异丙醇 (即若上清 30 mL, 则加入 21 mL 异丙醇)，充分混匀，室温 12000 rpm 离心 20 min。

(7) 轻轻将上清倾倒掉，可用纸巾将管壁异丙醇擦净 (避免擦掉 DNA 沉淀)，将离心管倒扣于纸上吸干管壁异丙醇，静置 5 min，加入 500-1000 μL Elution Buffer 溶解 DNA 沉淀 (可将离心管放入 56°C 水浴锅促进沉淀溶解)。

(8) 将上一步溶解的 DNA (如 250 μL)，加入 solution I 250 μL，室温静置 3-5 min。

(9) 加入 solution II 250 μL, 温和旋转离心管 4-6 次 (剧烈混合会使 DNA 断裂，降

低质粒纯度），获得澄清的裂解液，室温孵育 2 min。

（10）加入 solution III 350 μ L，温和颠倒数次混合，至出现白色絮状沉淀。室温 12000 rpm 离心 10 min。

（11）小心吸取上清，移至洁净的容积 2 mL 离心管的吸附柱中（此处用粉色柱子通常为胶回收所用吸附柱，滤膜更薄，易于质粒通过），保证没有吸入沉淀和碎片。室温 10000 rpm 离心 1 min，至裂解液完全通过吸附柱。

（12）弃滤过液，加入 500 μ L HBC Buffer，10000 rpm 离心 1 min，清洗吸附柱，除去残余蛋白质保证 DNA 的纯度以备后续实验使用。

（13）弃滤过液，用无水乙醇稀释的 750 μ L DNA Wash Buffer 清洗吸附柱，10000 rpm 离心 1 min，弃滤液。

（14）将吸附柱 10000 rpm 离心 2 min，确保乙醇被除去；于室温静置 8 min，晾干吸附柱内乙醇。

（15）将吸附柱放入干净的 1.5 mL EP 管中，加 30-50 μ L Elution Buffer 在滤膜上，室温静置 2-3 min，10000 rpm 离心 2 min。将 EP 管中液体吸回吸附柱滤膜上，再次 12000 rpm 离心 2-3 min，丢弃吸附柱。

（16）浓度测定：用 Elution Buffer 清洗超微量分光光度计，检空白调零后取 1.2 μ L 待检样品测定其浓度，-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

3.2.21 冠状病毒 S 蛋白介导的细胞-细胞膜融合实验

（1）产生一个表达冠状病毒 S 蛋白细胞系：

WT-293T/293T-FUT8-KO 细胞共转染 PBD-NF- κ B 质粒和 pAPN 质粒。

转染 PFR-LUC 质粒 24 孔板 0.75 μ g。

转染 TGEV-S 质粒 24 孔板 0.75 μ g。

（2）产生表达相应冠状病毒受体的细胞

293T 细胞转染 pFR-Luc 质粒 24 孔板 0.75 μ g。

293T 细胞转染质粒 TGEV-S 24 孔板 0.75 μ g。

（3）转染培养 24 h 后，将 293T 细胞进行消化，然后按照 2:1 比例覆盖在 WT-293T/293T-FUT8-KO 细胞上。

（4）24 h 后，细胞裂解，测荧光值。

3.2.22 萤火虫荧光素酶报告实验

- (1) 吸尽细胞培养液，24 孔板加入 200 μ L 细胞裂解液，轻轻旋转培养板使裂解液完全覆盖细胞。
- (2) 冰上孵育 5 min，充分裂解细胞。
- (3) 将荧光测定仪打开，设定参数，测定时间为 10 s，测定间隔为 2 s。
- (4) 取 50 μ L 裂解液加入测量管中（保持每次样品的加样量一致），另外加入 100 μ L 萤火虫萤光素酶检测试剂，震板混匀 2-3 次，充分混匀后测定 RLU(Relative light unit)。
- (5) 分析数据：
 - a.空白对照组：背景 F：未转染细胞+萤火虫萤光素酶检测试剂。空白对照组的样品量必须与实验样品量相同，包含与实验样品相同的培养基/血清组合，并加上完全相同的检测试剂。
 - b.实验组：转染细胞经实验化合物处理（即实验组 F）。
 - c.对照组：转染细胞不经处理，用以标准化结果（即对照组 F）。
- (6) 计算结果：实验组=实验组 F-背景 F。对照组=对照组 F-背景 F。表达倍数=实验组/对照组。

3.2.23 病毒吸附及内吞实验

(1) 吸附实验

细胞板提前放四度预冷，24 孔板 5 MOI 感染，4 $^{\circ}$ C 孵育 1 h，预冷的 PBS 洗三遍，每孔加入 1 mL TRIZOL 后提 RNA 去基因组反转成 cDNA，进行逆转录定量 PCR 分析。

(2) 内吞实验

用 TGEV(MOI=5)在 4 $^{\circ}$ C 条件下感染 PK-Cas9 和 FUT8-KO 细胞 1 h，用冷 PBS 冲洗去除未结合病毒，洗涤三次，在 37 $^{\circ}$ C 培养 30 min，用酸性 PBS-HCl (pH=3.0) 冲洗去除细胞表面未内化的病毒颗粒后，收集细胞裂解物进行逆转录定量 PCR 分析。

3.2.24 流式结合及分析实验

- (1) 转染处理好的细胞每孔加入 15 μ g/mL TGEV-S 蛋白，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。
- (2) 弃上清，加入 800 μ L 2%BSA 溶液，37 $^{\circ}$ C 封闭 10 min。胰酶消化 2 min，1200

rpm 离心 5 min。

(3) 弃上清, TGEV-S 多抗 (2% BSA 配制) 37 °C 孵育 45 min。2% BSA 重悬, 1200 rpm 离心 5 min, 弃上清, 1200 rpm 离心 5 min。

(4) 弃上清, 羊抗鼠 594 (1:1000) 37 °C 避光孵育 20 min, 在孵育期间每隔 10 min 拨动一下反应管, 防止细胞沉降到管底。

(5) 1200 rpm 离心 5 min。弃上清, 2% BSA 重悬 1200 rpm 离心 5 min。最后用 800 μ L 2% BSA 溶液重悬细胞, 流式分析仪分析 mCherry 通道阳性细胞总量。

3.2.25 病毒 RNA 的提取

(1) 取 200 μ L 的病毒原液, 加入 200 μ L 的 Buffer VGB、20 μ L 的 Proteinase K 和 1 μ L 的 Carrier RNA, 充分混匀于 56 °C 水浴温浴 10 min。

(2) 向裂解液中加入 200 μ L 的无水乙醇, 充分吸打混匀。

(3) 将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上, 溶液移至 Spin Column 中, 12,000 rpm 离心 2 min, 弃滤液。

(4) 将 500 μ L 的 Buffer RWA 加入 Spin Column 中, 12,000 rpm 1 min, 弃滤液。(5) 将 700 μ L 的 Buffer RWB 加入 Spin Column 中, 12,000 rpm 1 min, 弃滤液。(6) 重复操作步骤 5。

(7) 将 Spin Column 安置 Collection Tube 上, 12,000 rpm 2 min。

(8) 将 Spin Column 安置于新的 1.5 ml RNase free collection tube 上, 在 Spin Column 膜的中央处加入 30~50 μ L 的 RNase free dH₂O, 室温静置 5 min。

(9) 12,000 rpm 离心 2 min 洗脱 DNA/RNA。

3.3 统计分析

所有统计分析均通过 Microsoft Excel 2013 软件和 GraphPad Prism 8 软件进行。数据采用方差分析和 t 检验进行评估。ns 为无显著差异, P 值 < 0.05 为有统计学意义 (*), P 值 < 0.01 为有显著统计学差异 (**), P 值 < 0.001 为有非常显著的统计学差异 (***), P 值 < 0.0001 为有极其显著的统计学差异 (****)。

4 结果与分析

4.1 FUT8 敲除细胞系的构建及效果验证

4.1.1 利用 CRISPR/Cas9 技术在 PK-15 细胞上敲除 FUT8 基因

4.1.1.1 FUT8-sgRNA 慢病毒表达载体的构建

首先，我们使用在线 sgRNA 设计工具(<http://crispor.tefor.net/>)设计了用于敲除 FUT8 的 sgRNA，将 sgRNA 退火成双链后连接到慢病毒载体 lenti-sgRNA-EGFP 上，连接产物转化，测序正确后通过三质粒慢病毒包装系统包装成慢病毒。

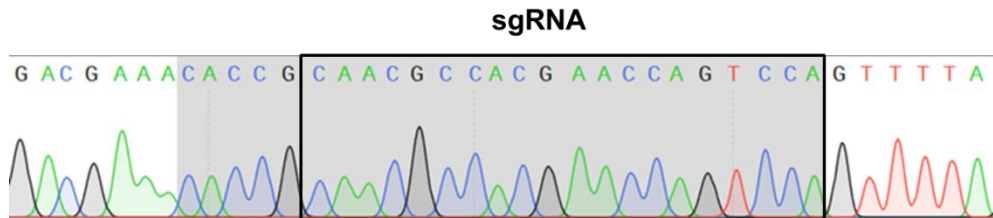


图 4-1 FUT8-sgRNA 慢病毒表达载体测序结果

Fig. 4-1 FUT8-sgRNA-lentiviral expression vector sequencing results

4.1.1.2 FUT8 敲除细胞系的构建与单克隆筛选

我们用包装好的慢病毒感染稳定表达 cas9 基因的 PK-15 细胞系（细胞密度约为 30%），48 h 后于荧光显微镜下观察荧光。流式分选单克隆细胞，待细胞从单个细胞长至密度 50%以上时，传代扩大培养以进行下一步实验。

4.1.1.3 FUT8 敲除单克隆细胞系的敲除效果及细胞活力验证

首先，我们提取了单克隆细胞的基因组，扩增 sgRNA 两端约 400bp 的片段并测序，测序结果（图 4-2A）显示 FUT8 基因敲除成功。WB（图 4-2B）结果也证明，在 FUT8 敲除细胞系中 FUT8 蛋白的表达量显著降低。接下来，我们通过 MTS 法检测了野生型细胞与 FUT8 敲除细胞系的细胞活力，结果（图 4-2C）显示 FUT8 敲除对于细胞活力没有显著影响。

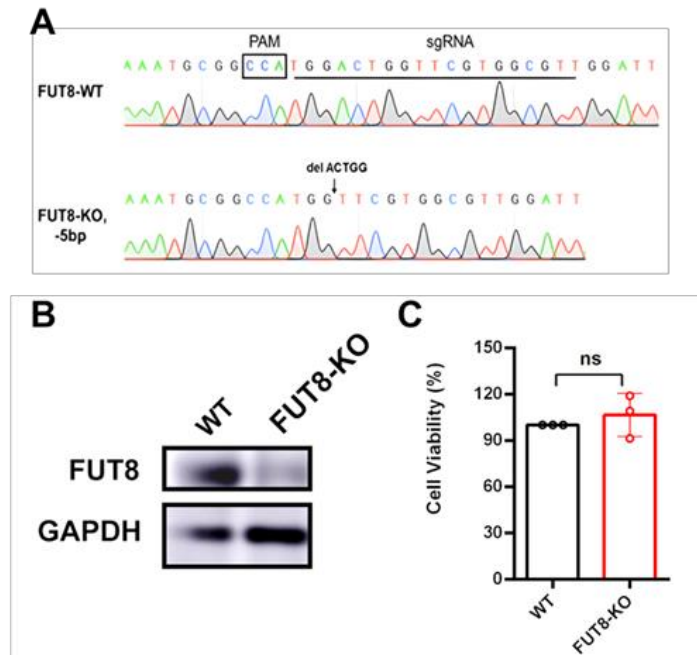


图 4-2 FUT8 敲除效果及单克隆细胞活力验证

Fig. 4-2 FUT8 knockout effect and cell viability verification of monoclonal cells

A: FUT8 基因组测序结果; B: WB 检测 FUT8 蛋白表达量; C: MTS 法检测细胞活力

A: FUT8 genome sequencing results; B: WB analysis the expression of FUT8 protein. C: Cell viability was detected by MTS assay

4.1.2 FUT8 基因敲除显著抑制的 TGEV 复制

在成功构建 FUT8 敲除细胞系后，我们分别用 1 MOI 和 0.01 MOI 的 TGEV 感染野生型与 FUT8 敲除细胞，24 h 后固定细胞，然后使用间接免疫荧光（IFA）测定法检测细胞中 TGEV N 蛋白表达的表达式（图 4-3A）。结果显示，在 FUT8 敲除细胞中，TGEV N 蛋白的表达量显著低于野生型细胞。同时，在感染 0.01 MOI TGEV 后对 FUT8 敲除细胞中 TGEV 病毒滴度的进一步研究显示，FUT8 敲除细胞在不同时间点（12、24、36 和 48 h）表现出对 TGEV 复制的持续抑制作用（图 4-3B）。与上述检测结果一致，WB 结果（图 4-3C）显示 FUT8 敲除细胞中没有 TGEV N 蛋白积累。这些结果表明，FUT8 是 TGEV 复制所必需的关键宿主因子。

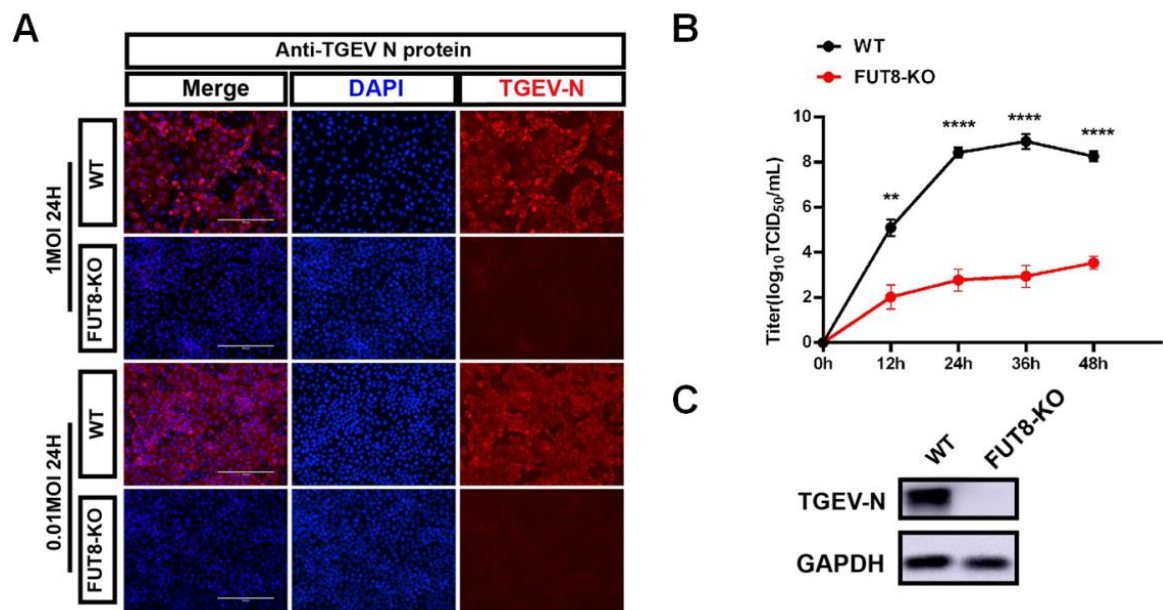


图 4-3 TGEV 在 FUT8 敲除细胞上的复制情况

Fig. 4-3 Replication of TGEV on FUT8 knockout cells

A: IFA 法检测 TGEV N 细胞内表达情况（标尺长度为 200 μm ）；B: 感染细胞上清毒价测定；

C: WB 检测 TGEV N 蛋白表达量

A: IFA detects the expression of TGEV N protein (scale bar, 200 μm); B: Determination of supernatant virus titer on infected cells; C: WB analysis the expression of TGEV N protein

4.1.3 FUT 家族其他成员敲除效果验证

岩藻糖基化转移酶家族除了 FUT8 外还有 12 个成员。除 FUT8 外，FUT1-7，FUT9-13 均为末端岩藻糖基化转移酶，为了探索 FUT 家族其他成员对 TGEV 复制的影响，我们在 PK-15 细胞上分别构建了 FUT1-5、FUT7、和 FUT9-13 基因（猪 FUT6 基因的序列尚未解出）敲除细胞系。基因组测序结果（图 4-4）证明基因成功敲除。

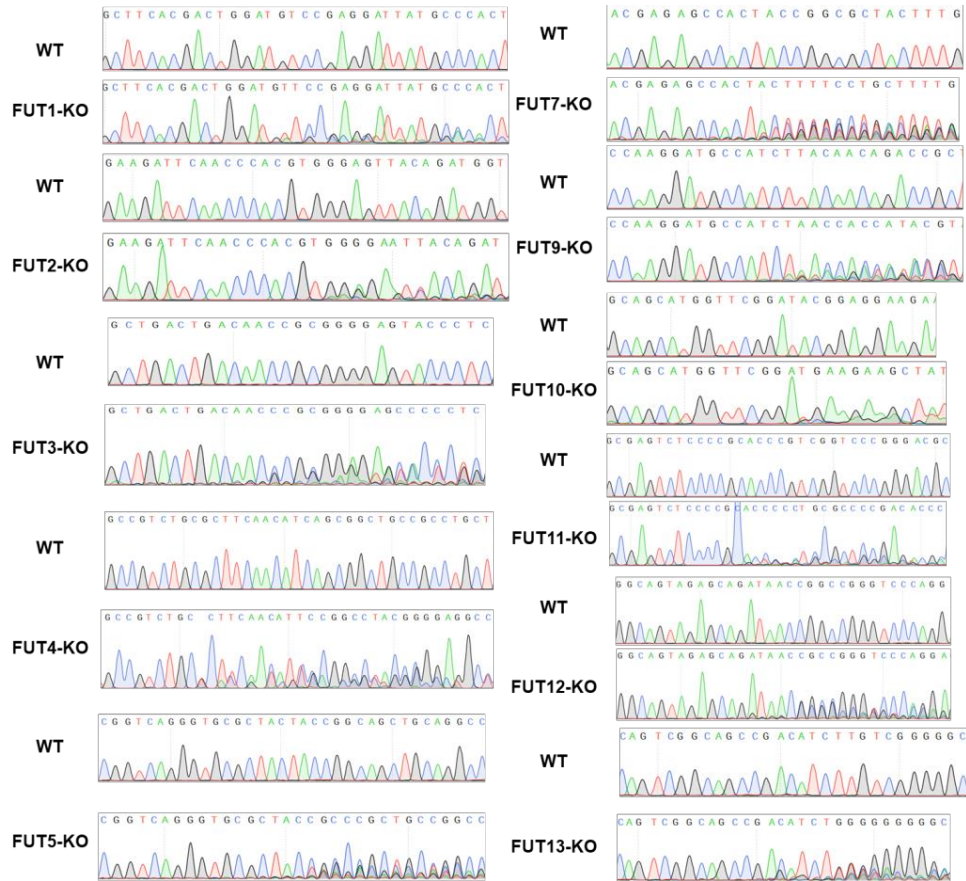


图 4-4 FUT1-13 基因敲除细胞基因组测序

Fig. 4-4 Genome sequencing of FUT1-13 knockout cells

接下来我们分别用 0.01 MOI TGEV 感染敲除细胞,间接免疫荧光结果(图 4-5)表明,FUT 家族其他成员对于 TGEV 复制的影响均没有 FUT8 显著。以上结果说明,FUT8 是 TGEV 复制所必需的关键宿主因子。

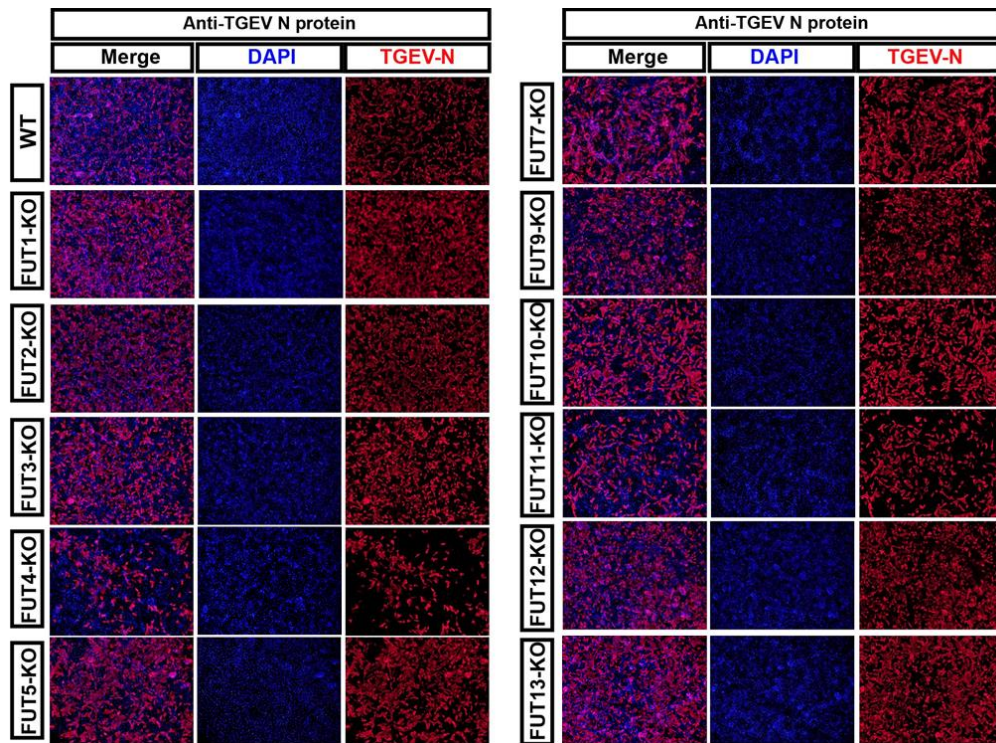


图 4-5 TGEV 在 FUT1-13 基因敲除细胞中的复制

Fig. 4-5 TGEV replication on FUT1-13 knockout cells

4.2 TGEV 复制依赖于 FUT8 的核心岩藻糖基转移酶活性

4.2.1 回补 FUT8 酶活突变体无法回复 TGEV 的复制

有研究表明，用丙氨酸取代 FUT8 基因 365 位点上编码的精氨酸会导致 FUT8 酶活的完全丧失(Takahashi et al 2000) (图 4-6A)。FUT8 是 FUT 家族中唯一一种核心岩藻糖基转移酶。为了确定 FUT8 与病毒复制相关的转移酶作用，我们分别构建了 FUT8 基因全长质粒和 FUT8 基因 365 位点突变质粒 (R365A)，并分别瞬时转染了 FUT8 基因敲除细胞以进行过表达回补实验。1 MOI TGEV 感染 24 h 后检测细胞内 FUT8 基因表达量及病毒拷贝数。RT-qPCR 的结果显示 FUT8 和 FUT8-R365A 突变体在 FUT8 敲除细胞中成功回补 (图 4-6B)，且与 FUT8 野生型全长相比，FUT8-R365A 突变体的回补无法恢复病毒感染 (图 4-6C)。

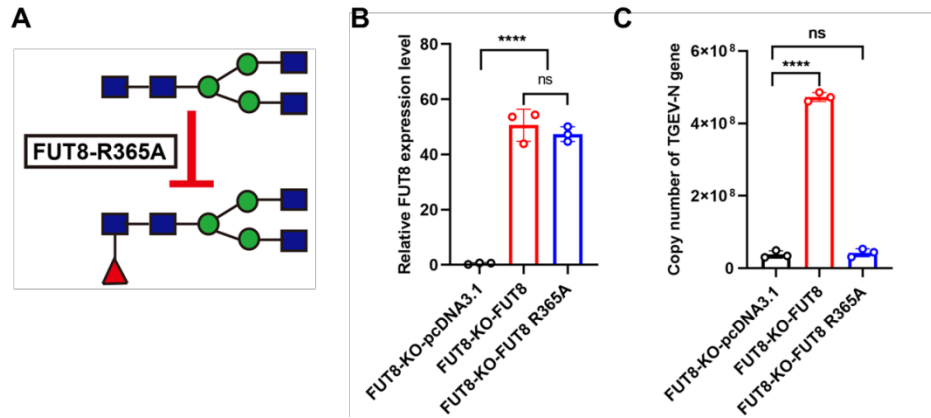


图 4-6 回补 FUT8 全长及酶活丧失突变基因

Fig. 4-6 Supplementation of FUT8 full-length and enzyme activity loss mutant genes

A: FUT8 酶活位点突变模式图; B: 过表达回补细胞 FUT8 表达水平; C: 过表达回补细胞中 TGEV 复制情况

A: Schematic diagram of FUT8 enzyme active site mutations; B: FUT8 expression level in refill cells;

C: TGEV replication in reclaimed cells.

4.2.2 岩藻糖基化转移酶抑制剂 2PF 影响 TGEV 的复制

4.2.2.1 抑制剂细胞活力测试

为了进一步验证 FUT8 的核心岩藻糖基转移酶活性是否对病毒感染至关重要，我们使用不同浓度的岩藻糖基化转移酶抑制剂 2F-Peracetyl-Fucose (以下简称为 2PF) 处理 PK-15 细胞。在分别用 50、200、400、600、800 μM 的 2PF 处理细胞 5d 后，使用 MTS 细胞活力检测法检测了细胞活力，结果显示（图 4-7），50-800 μM 浓度的 2PF 对 PK-15 细胞的细胞活力均没有显著影响。

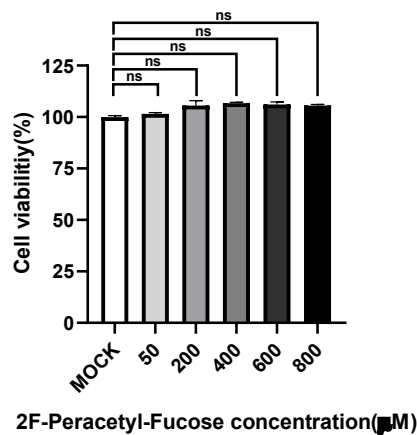


图 4-7 MTS 法检测抑制剂 2PF 处理后细胞的活力

Fig. 4-7 MTS method measures the viability of cells treated with inhibitor 2PF

4.2.2.2 抑制剂对 TGEV 复制的影响

接下来，我们分别用 0.1MOI TGEV 感染了用 50、200、400、600、800 μM 的 2PF 处理了 5d 的 PK-15 细胞，24 h 后收取细胞上清液并固定细胞。上清毒价测定结果（图 4-8A）和细胞中 TGEV-N 蛋白表达情况（图 4-8B）显示，400 和 600 μM 的 2PF 对 TGEV 的复制有一定的抑制作用，而 800 μM 的 2PF 则可以显著抑制 TGEV 的复制。综上所述，FUT8 对 TGEV 复制的影响依赖于其酶活。

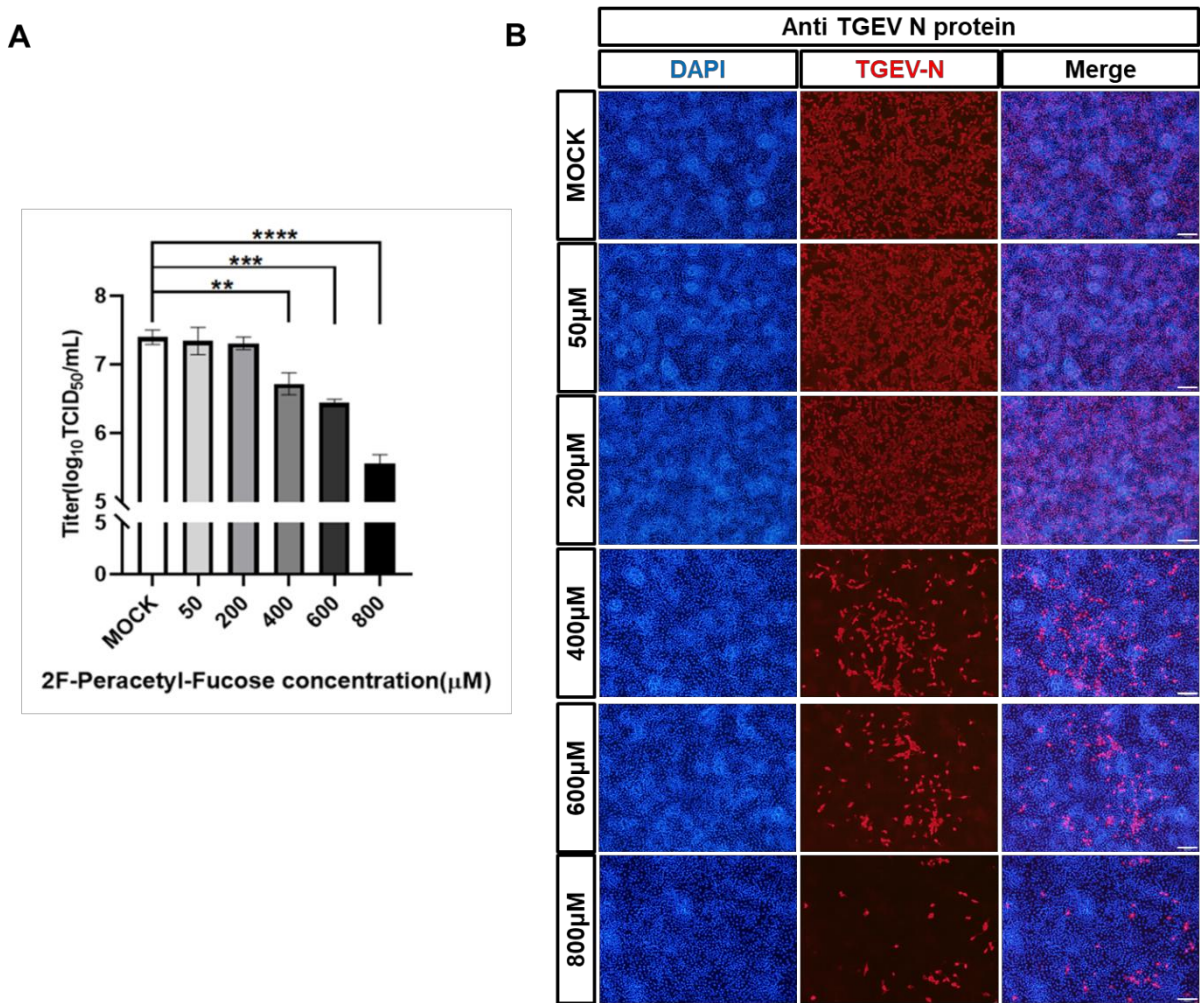


图 4-8 岩藻糖基化抑制剂 2PF 抑制 TGEV 复制

Fig. 4-8 The fucosylation inhibitor 2PF inhibits TGEV replication

A: 感染细胞上清毒价测定; B: IFA 法检测 TGEV N 蛋白表达情况 (标尺长度为 100 μm)

A: Determination of supernatant virus titer on infected cells; B: IFA detects the expression of TGEV N protein (scale bar, 100 μm)

4.3 TGEV 在 FUT8 敲除细胞系上的复制受损阶段探究

4.3.1 FUT8 敲除不影响 TGEV 在细胞内的复制

为了进一步探究 FUT8 影响 TGEV 复制的具体机制，我们通过透射电镜直接观察了细胞内部病毒的复制情况。结果显示（图 4-9A），FUT8 敲除细胞中几乎没有观察到病毒粒子的形成。感染 TGEV 8 h (MOI= 0.1)后细胞中病毒 dsRNA 的检测情况显示（图 4-9B），TGEV 在 FUT8 敲除细胞系中 dsRNA 的合成受阻。

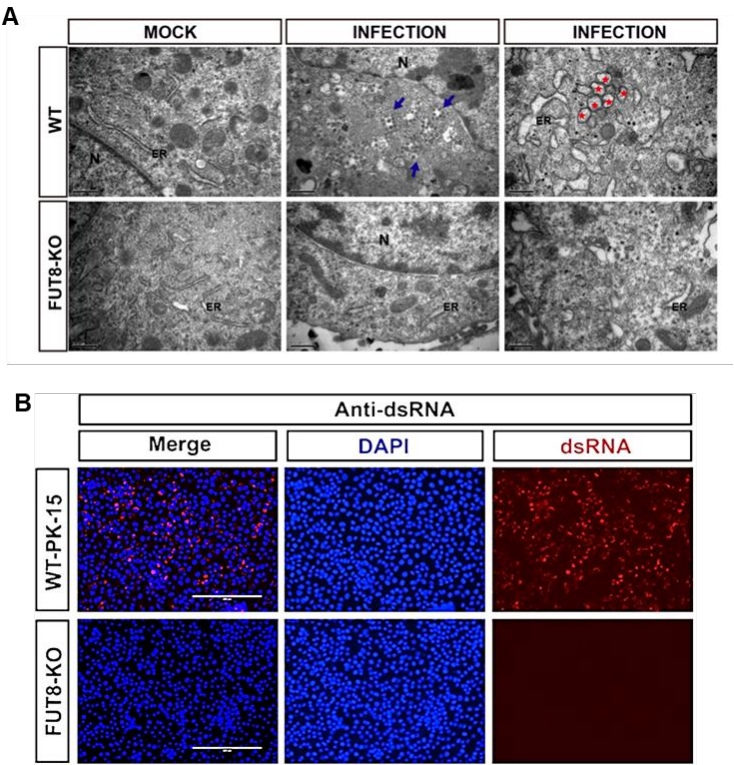


图 4-9 TGEV 在 FUT8-KO 细胞内的早期复制情况

Fig. 4-9 Early replication of TGEV in FUT8-KO cells

A: 透射电镜观察细胞内部；蓝色箭头指向病毒粒子；红色五角星标志着 DMVs；N：细胞核；ER：内质网 B: IFA 法检测 dsRNA 合成情况（标尺长度为 200 μm ）

A: Transmission electron microscopy observes the inside of the cell; The blue arrow points to the virion; The red pentagram marks DMVs; N: nucleus; ER: endoplasmic reticulum; B: IFA detects the expression of dsRNA (scale bar, 200 μm)

由于 TGEV 在 FUT8 敲除细胞内的早期复制受到了严重的抑制，我们接下来探究了其复制阶段是否受损。我们分别构建了 pAPN 敲除细胞和 pAPN-FUT8 双敲细胞系，并分别在这两种细胞中转染了 TGEV-BAC。荧光定量 PCR 结果（图 4-10）显示，pAPN 敲除细胞和 pAPN-FUT8 双敲细胞中的 TGEV 病毒拷贝数没有显著差异。

综上所述，FUT8 敲除不影响 TGEV 在细胞内的复制阶段。

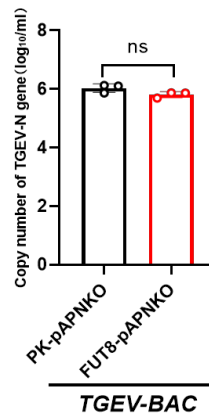


图 4-10 pAPN 敲除细胞和 pAPN-FUT8 双敲细胞中 TGEV-N 的拷贝数

Fig. 4-10 Copy number of TGEV-N in pAPN-KO cells and FUT8-pAPN-KO cells

4.3.2 FUT8 通过酶活调控 TGEV 入侵阶段

为了验证 TGEV 在 FUT8 敲除细胞上的入侵阶段是否受到影响，我们分别在野生型、FUT8-KO 和 pAPN-KO 细胞上进行了吸附和内吞实验。结果显示，TGEV 在 FUT8-KO 细胞上的吸附（图 4-11A）受到了严重抑制，内吞阶段（图 4-11B）也受到了影响。为了进一步探究 TGEV 在入侵阶段受到的影响，我们在野生型细胞上表达了 TGEV S 基因，分别和野生型细胞以及 FUT8-KO 细胞进行了膜融合实验，结果显示（图 4-11C）TGEV S 蛋白入侵 FUT8-KO 细胞的效率显著降低。

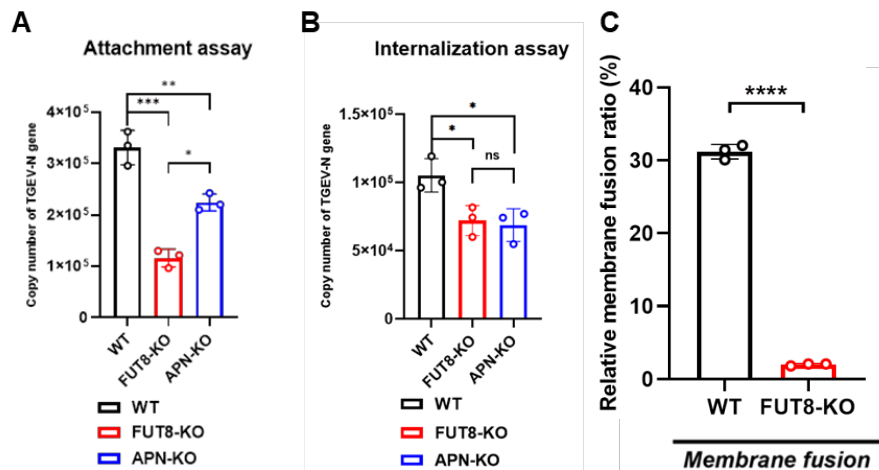


图 4-11 FUT8 基因敲除抑制 TGEV 在细胞上的入侵阶段

Fig. 4-11 FUT8-KO inhibits the invasion phase of TGEV on cells

A/B: TGEV 吸附和内吞实验；C: 膜融合实验检测 TGEV S 蛋白入侵效率

A/B: TGEV attachment and internalization assay; C: Membrane fusion assay detects the invasion efficiency of TGEV S protein

接下来，我们想探究 FUT8 的酶活对 TGEV 入侵是否存在影响。我们用前文提到的 800 μM 的岩藻糖基化酶抑制剂 2PF 处理 PK-15 细胞 5d 后，进行了 TGEV 吸附和内吞实验。结果显示（图 4-12），800 μM 的抑制剂 2PF 可以显著抑制 TGEV 的吸附和内吞阶段。综上所述，FUT8 通过其酶活参与 TGEV 的入侵阶段。

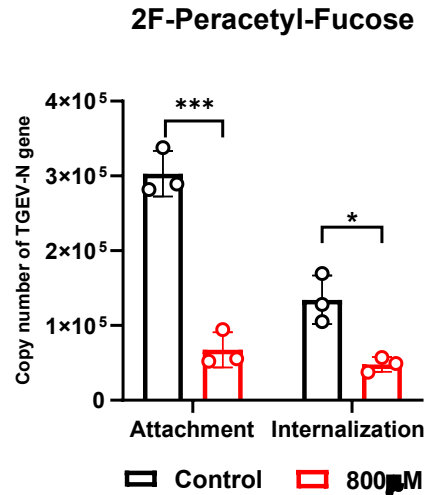


图 4-12 抑制剂处理后的吸附/内吞实验

Fig. 4-12 Attachment and internalization assay after inhibitor treatment

4.3.3 FUT8 敲除通过影响 pAPN 抑制 TGEV 入侵

接下来，我们想探究 FUT8 基因敲除对 TGEV 入侵的具体影响，我们首先检测了 FUT8 敲除细胞中 pAPN 的表达量。结果显示（图 4-13A），pAPN 在 FUT8 敲除细胞中的表达量与野生型没有显著差异。为了进一步检测 FUT8 敲除细胞中 pAPN 是否受损，我们构建了 HEK293T-FUT8 敲除细胞系（图 4-13B），并分别在野生型 HEK293T 细胞和 HEK293T-FUT8 敲除细胞上表达了 pAPN，随后和表达了 TGEV S 蛋白的野生型细胞进行膜融合实验，结果显示（图 4-13C），在宿主细胞 pAPN 表达量一致的情况下，TGEV S 入侵 FUT8-KO 细胞上 pAPN 的效率显著降低。综上所述，FUT8 敲除通过影响 pAPN 抑制 TGEV 入侵。

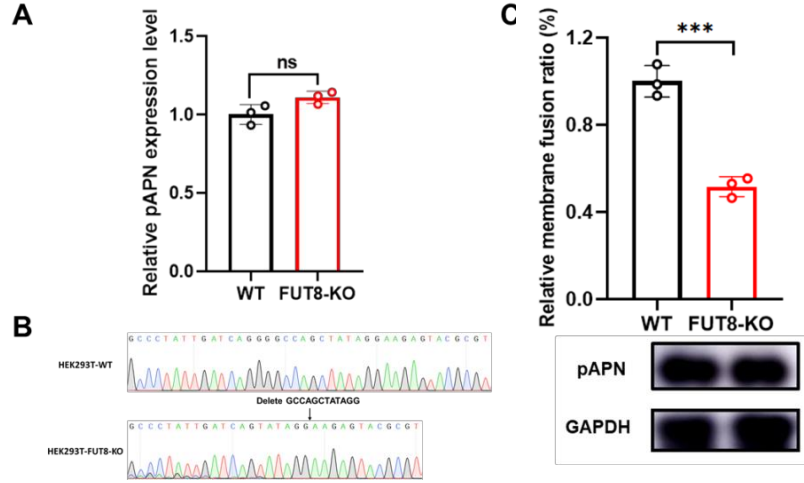


图 4-13 FUT8 敲除细胞上 pAPN 的表达情况

Fig. 4-13 Expression of pAPN on FUT8 knockout cells

A: pAPN 的表达量; B: 构建 HEK293T-FUT8 敲除细胞系; C: 膜融合实验检测 pAPN 的功能

A: Expression of pAPN; B: Construction of HEK293T-FUT8 knockout cell line; C: Membrane fusion assay detects the the function of pAPN

4.4 FUT8 通过核心岩藻糖基化调控宿主 pAPN 影响 TGEV 入侵

4.4.1 FUT8 敲除降低了 pAPN 与 TGEV-S 蛋白的结合效率

为了进一步探究核心岩藻糖基化转移酶 FUT8 缺失对于宿主 APN 的影响,我们分别在 HEK293T 细胞和 HEK293T-FUT8-KO 细胞上表达了 pAPN,在使用 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TGEV-S 蛋白孵育后进行了流式细胞检测实验,结果显示(图 4-14),核心岩藻糖基化的缺失显著降低了 pAPN 与 TGEV-S 蛋白的结合效率。

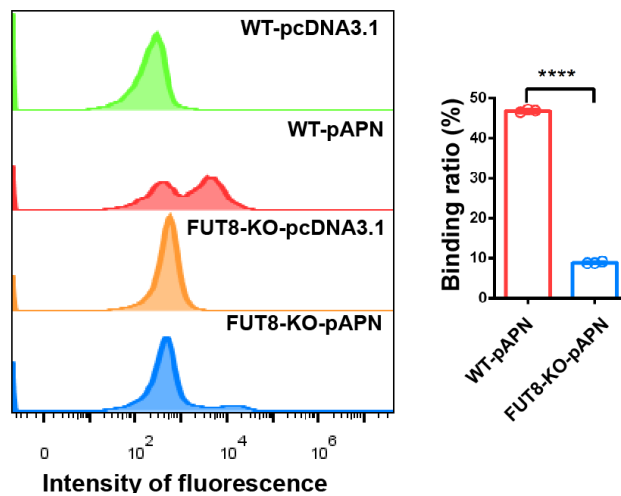


图 4-14 流式细胞术检测 TGEV S 与 pAPN 结合效率

Fig. 4-15 Flow cytometry detects the binding efficiency of TGEV S and pAPN

4.4.2 pAPN N736 位点的核心岩藻糖基化影响 TGEV 的入侵

由于核心岩藻糖基化通常附着在 N-糖基上, 为了进一步探究核心岩藻糖基化的缺失具体影响了 pAPN 上哪些位点从而导致 TGEV S 的结合受阻, 我们首先研究了 pAPN 上的 N-糖基化位点。我们分析了已经报道的 pAPN-PRCV-RBD 复合物 (PDB:4F5C) 的结构 (TGEV-RBD 与 pAPN 复合物的晶体结构尚未解出, 且 PRCV-RBD 与 TGEV RBD 的序列同一性高达 97%)。通过结构分析和睫毛图分析, 我们发现 RBD 的 Gln306 侧链与 pAPN 的 Asn736 侧链及其上的 N-糖基形成氢键相互作用网络, 两者之间还存在疏水相互作用力。

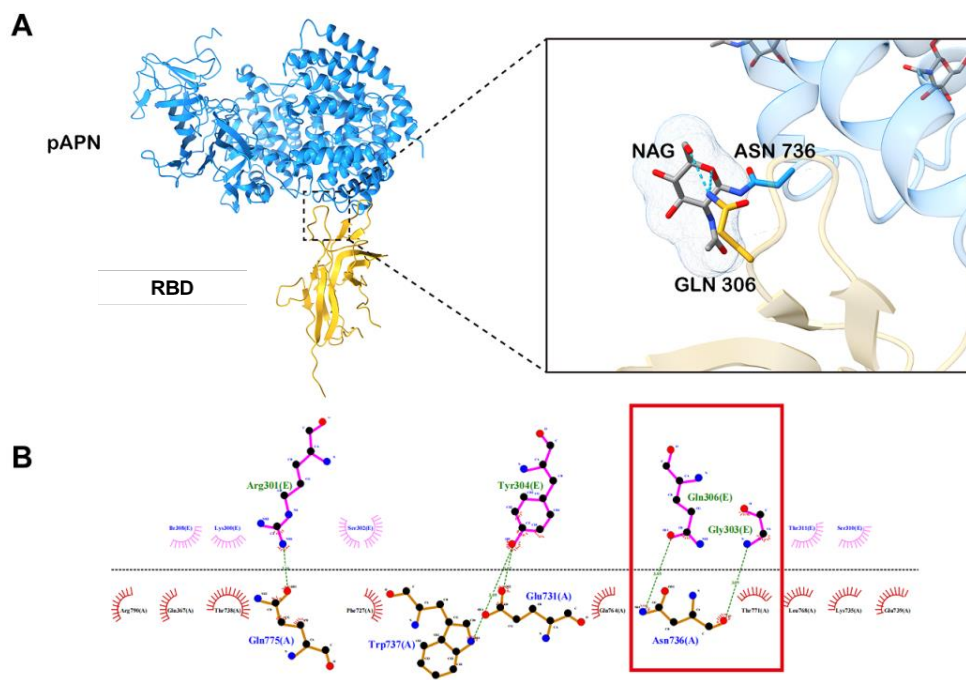


图 4-15 pAPN- RBD 复合物结构分析

Fig. 4-15 Structural analysis of pAPN- RBD complexes

A: pAPN-PRCV-RBD 复合物的晶体结构(PDB:4F5C); B: TGEV RBD 与 pAPN 之间的相互作用

A: Crystal structure of the pAPN-PRCV-RBD complex; B: The interaction between TGEV RBD and pAPN

为了进一步验证 FUT8 敲除导致的核心岩藻糖基化的缺失是否会使 pAPN N736 位点受损。我们构建了 pAPN-N736A 质粒 (将 736 位点的氨基酸 N 突变为 A 会使 736 位点丧失 N-糖基化), 并分别转染了 HEK293T 细胞和 HEK293T-FUT8-KO 细胞。接下来, 我们通过流式结合实验直接检测了 TGEV S 蛋白和它们的结合效率。结果表明, TGEV S 与野生型细胞上的 pAPN 的结合效率显著高于其他三者 (图 4-16)。同时, TGEV S 与野生型和 FUT8-KO 细胞上表达的 pAPN-N736A 的结合效率没有

显著差异，这表明 pAPN 其他位点的核心岩藻糖基化对于 TGEV 的入侵几乎没有影响。同时，在 FUT8 敲除细胞上表达的 pAPN 736 位点突变与否对 TGEV S 的结合效率没有显著影响，说明丧失核心岩藻糖基化后 736 位点的 N 糖基化缺失不再影响 TGEV S 的入侵。即 pAPN N736 位点的核心岩藻糖基化参与了 TGEV 的入侵。

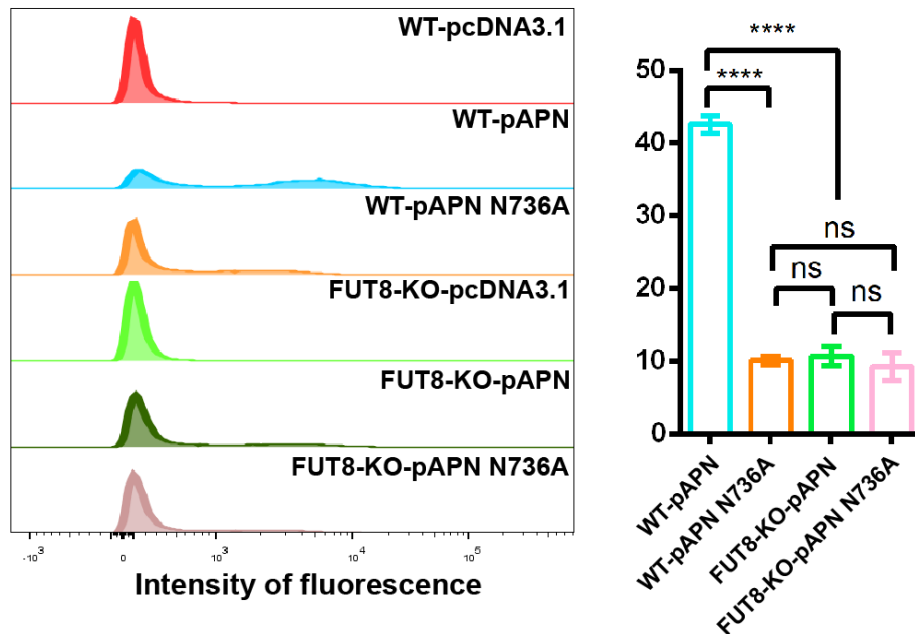


图 4-16 流式结合实验检测 TGEV S 与 pAPN 的结合效率

Fig. 4-16 Flow cytometry detects the binding efficiency of TGEV S and pAPN

为了进一步验证该结果，我们分别在 HEK293T 和 HEK293T-FUT8-KO 细胞上表达了 pAPN 和 pAPN-N736A，并与表达了 TGEV S 的 HEK293T 细胞进行膜融合实验，原理如图 4-17。

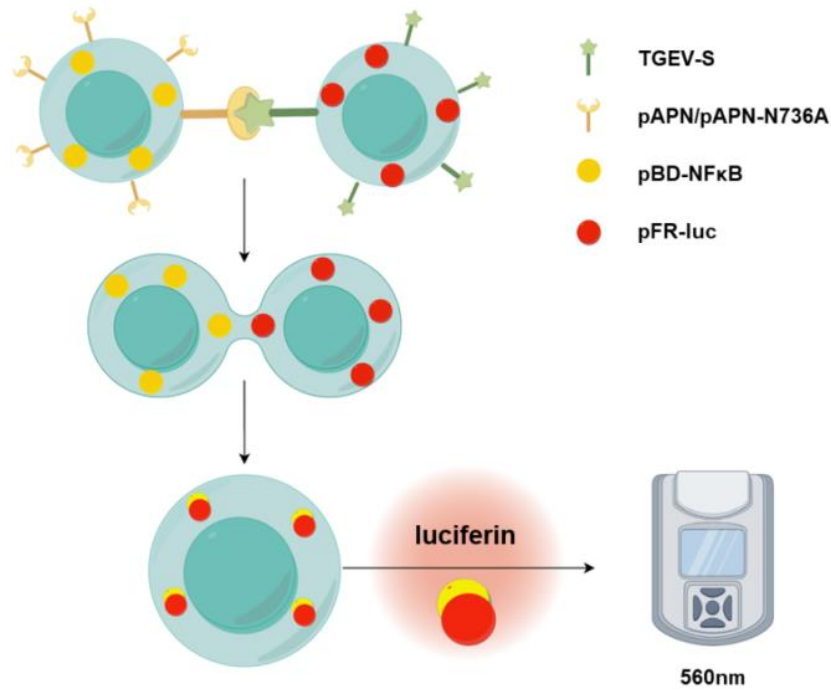


图 4-17 膜融合模式图（本图使用 Figdraw 绘制）

Fig. 4-17 Diagram of membrane fusion (By Figdraw)

一个细胞共转染 PBD-NF- κ B 和 pAPN 质粒，另一个细胞转染 pFR-Luc 和 TGEV-S 质粒，膜融合后 PBD-NF- κ B 和 pFR-Luc 共同表达出萤火虫荧光素酶，裂解细胞加入荧光素酶底物，测量 560nm 波长荧光值。

One cell was co-transfected with PBD-NF- κ B and pAPN plasmids, and the other cell was transfected with pFR-Luc and TGEV-S plasmids, and after membrane fusion, PBD-NF- κ B and pFR-Luc co-expressed firefly luciferase, and the lysed cells were added with substrate, and the 560 nm luminescence value was measured.

结果显示,FUT8 敲除和 736 位点突变对于 pAPN 的表达量没有影响(图 4-18A), 而膜融合实验(图 4-18B)与流式结合实验的结果基本符合。综上所述, pAPN N736 位点的核心岩藻糖基化在 TGEV 的入侵中扮演了重要的角色。

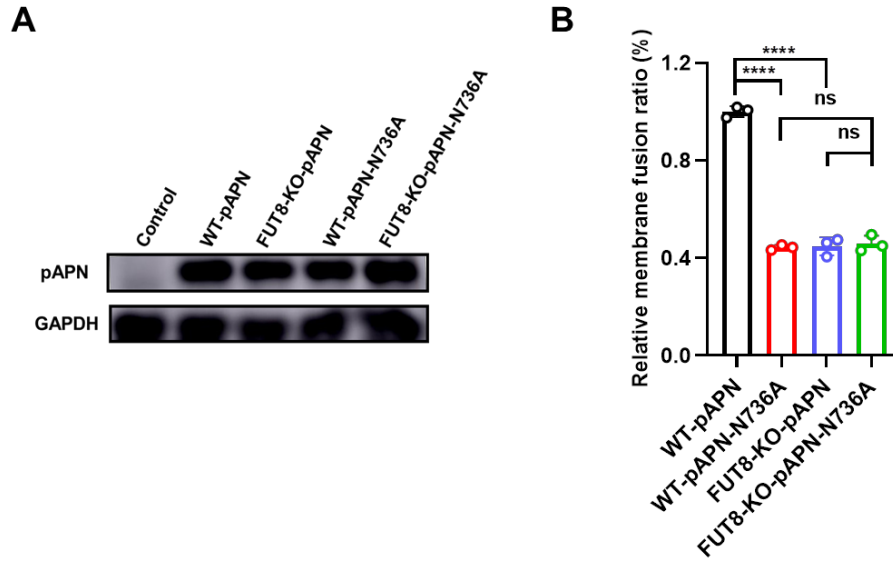


图 4-18 pAPN-736 位点点突变实验

Fig. 4-18 pAPN-736-site mutation assay

A: pAPN 蛋白表达量; B: 膜融合实验检测 TGEV S 入侵效率

A: Expression level of pAPN protein; B: Membrane fusion assay detects the invasion efficiency of TGEV S

4.5 FUT8 对其他以 APN 为受体的冠状病毒入侵过程的影响

4.5.1 fAPN N740 位点的核心岩藻糖基化影响 FIPV 的入侵

为了进一步探究 N736 位点的核心岩藻糖基化对冠状病毒复制的影响，我们通过分析 4 个不同物种的 APN 序列（这 4 种 APN 分别是不同冠状病毒的受体），发现 pAPN 上的 736 位点非常保守（图 19A），在 cAPN 上和 fAPN 上都有与之相对应的位点（cAPN 的 747 位点和 fAPN 的 740 位点）。cAPN 的 747 位点已有结构解出含有核心岩藻糖基化（图 19B）（PDB: 7U0L）。fAPN 的具体结构尚未解出，但 fAPN 相对应的位点（N740 位点）具有 N 糖基化基序（图 19A）。

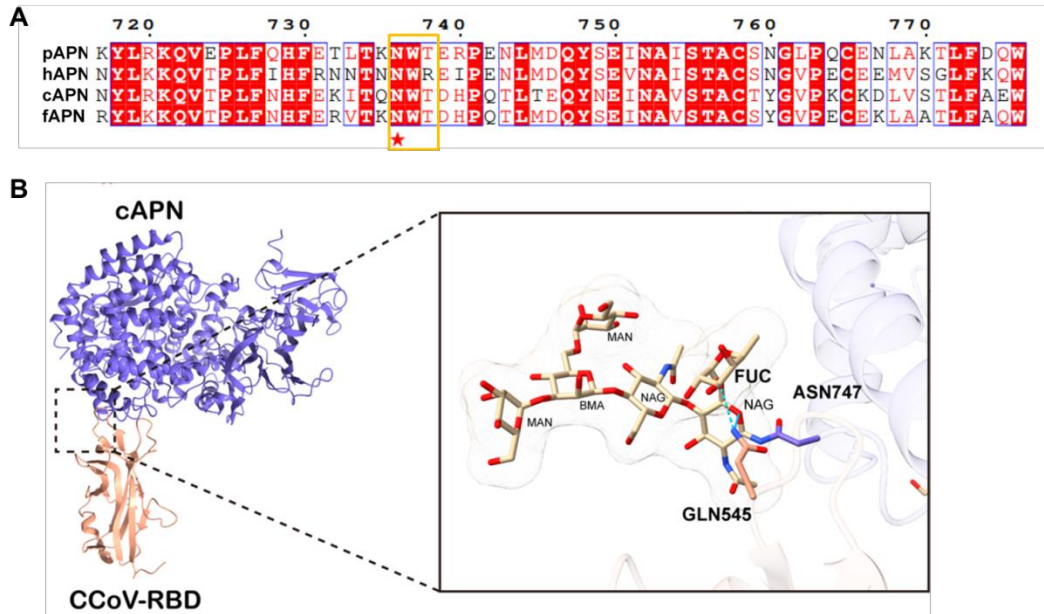


图 4-19 cAPN N747 位点存在核心岩藻糖基化

Fig. 4-19 The N747 site of cAPN is modified by core fucosylation

A: 四个不同物种 APN 的序列对比图; B: cAPN-CCoV-RBD 复合物的晶体结构(PDB: 7U0L)

A: Sequence comparison of APNs of four different species; B: Structure of the cAPN-CCoV-RBD complex

为了验证 FUT8 敲除对于 FIPV 的影响,我们在猫肾细胞 CRFK (feline kidney cell) 上构建了 FUT8 敲除细胞系 (图 20A)。在用 0.1MOI 的 FIPV 感染细胞 24 h 后, 上清毒价的测定结果显示 FUT8-KO 抑制了 FIPV 的复制 (图 20B)。接下来我们进行了 fAPN N740A 点突变膜融合实验, 结果证明 (图 20C) fAPN N740 位点的核心岩藻糖基化参与了 FIPV 的入侵。

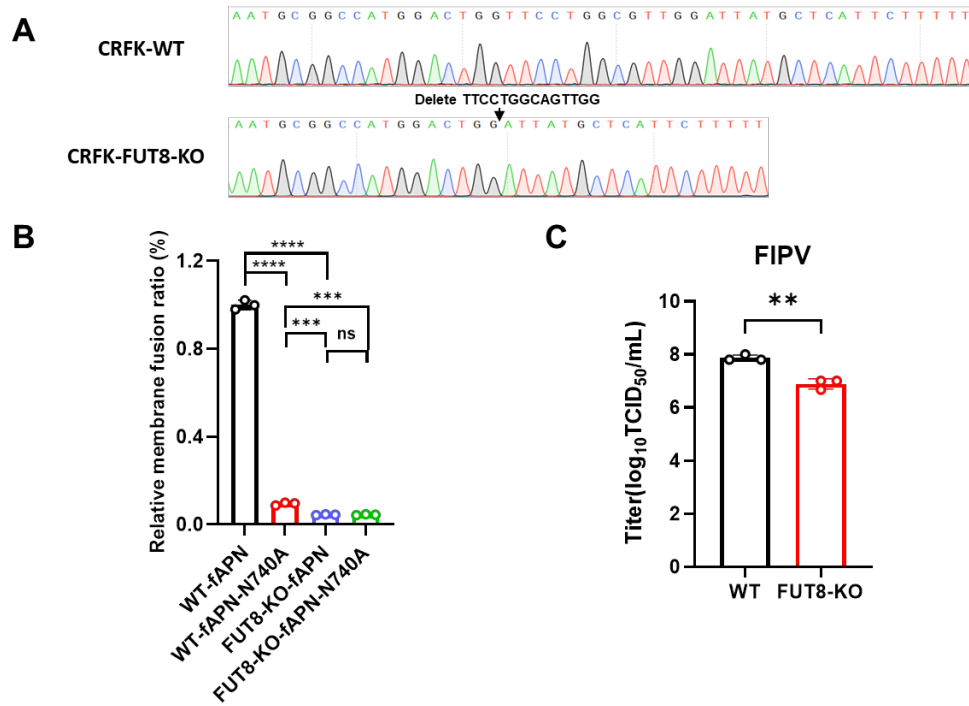


图 4-20 fAPN 核心岩藻糖基化对 FIPV 复制的影响

Fig. 4-20 Effect of fAPN core fucosylation on FIPV replication

A: 构建 CRFK-FUT8 基因敲除细胞系; B: 膜融合实验检测 FIPV S 入侵效率; C: FIPV 上清毒价测定
A: Construction of CRFK-FUT8 knockout cell line; B: Membrane fusion assay detects the invasion efficiency of FIPV;
C: Determination of the virus titer of the supernatant on FIPV S

4.5.2 FUT8 敲除不影响 HCoV-229E 的入侵

通过序列分析,我们发现人 APN 上与 736 位点相对应的位点缺乏 N-糖基化基序,即相应位点不含有 N-糖基化。我们在 HuH-7 (人肝癌细胞) 细胞上敲除了 FUT8 基因 (图 4-21A) 并感染了 HCoV-229E, 结果表明 FUT8-KO 对 HCoV-229E 的复制没有影响 (图 4-21B、C)。

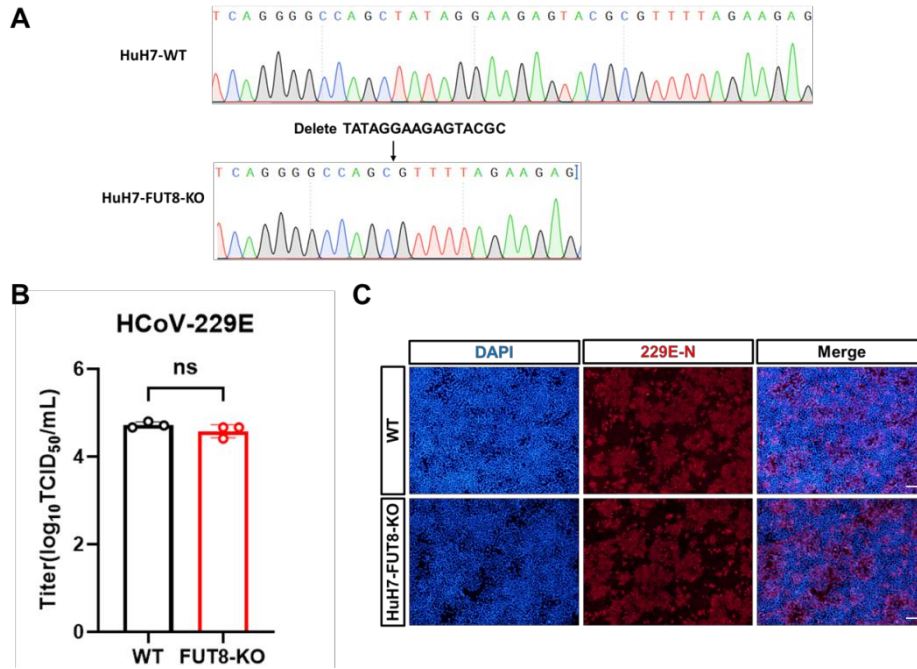


图 4-21 FUT8 敲除不影响 HCoV-229E 的复制

Fig. 4-21 FUT8 knockout does not affect the replication of HCoV-229E

A: 构建 HuH-7-FUT8-KO 细胞系; B: HCoV-229E 上清毒价测定; C: IFA 检测 HCoV-229E 复制情况

A: Construction of HuH-7-FUT8-KO cell line; B: Determination of the virus titer of the supernatant on HCoV-229E; C: IFA assay detects the HCoV-229E replication

4.6 FUT8 敲除影响 TGEV S 蛋白表达从而抑制病毒粒子形成

为了进一步探究 FUT8 敲除对于病毒本身的影响,我们分别在 HEK293T 细胞和 HEK293T-FUT8 敲除细胞上表达了 TGEV S, 并与表达了 pAPN 的 HEK293T 细胞进行了膜融合实验。结果显示 FUT8-KO 细胞上表达的 TGEV S 受损 (图 4-22A), 且表达量降低 (图 4-22B)。为进一步模拟 TGEV 感染过程中 TGEV S 表达情况,我们在 pAPN-KO 和 pAPN-FUT8 双敲细胞系中转染了 TGEV-BAC, 结果表明, TGEV S 在 pAPN-FUT8-KO 细胞中的 mRNA 水平与 pAPN-KO 细胞没有显著差异 (图 4-22C), 但蛋白表达水平相较于 pAPN-KO 细胞有所降低 (图 4-22D)。同时 FUT8-KO 细胞产生的上清病毒粒子数显著低于 pAPN-KO 细胞 (图 4-22E、F)。以上结果说明, FUT8 敲除影响 TGEV S 蛋白表达, 进而抑制了感染性病毒粒子的形成。

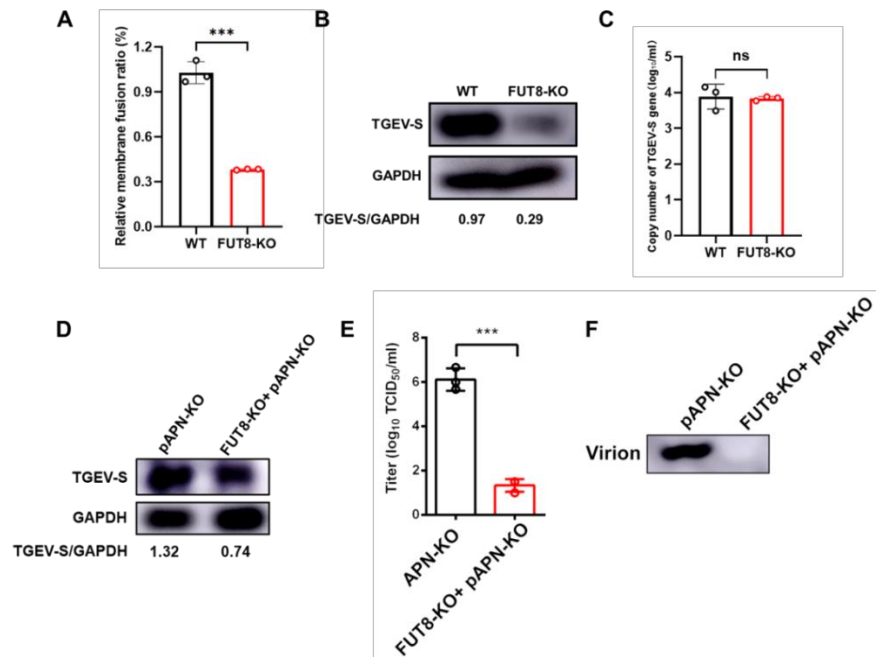


图 4-22 FUT8 敲除抑制 TGEV S 蛋白的表达以抑制病毒粒子的形成

Fig. 4-22 FUT8-KO inhibits the expression of TGEV S protein to inhibit virion formation

A: FUT8-KO 细胞上表达的 TGEV S 受损; B: WB 检测 TGEV S 表达量; C: TGEV S 基因拷贝数; D: 转染 TGEV-BAC 后细胞内 TGEV S 蛋白表达量; E: 上清毒价测定; F: 上清病毒粒子数检测

A: Construction of Vero-FUT8-KO cell line; B: WB analysis the expression of TGEV S; C: The copy number of TGEV S; D: Intracellular TGEV S protein expression after transfection with TGEV-BAC E: The virus titer of the supernatant;

F: The virion count of the supernatant

4.7 FUT8 敲除对 FIPV 和 HCoV-229E S 蛋白的影响

我们分别在 HEK293T 野生型和 FUT8-KO 细胞上表达了 FIPV S 和 HCoV-229E S 并检测了表达量,结果表明,FIPV S 在 FUT8-KO 细胞上的表达量显著降低(图 23-A),而 HCoV-229E S 在 FUT8-KO 细胞上的表达量与野生型没有差异(图 23-B)。

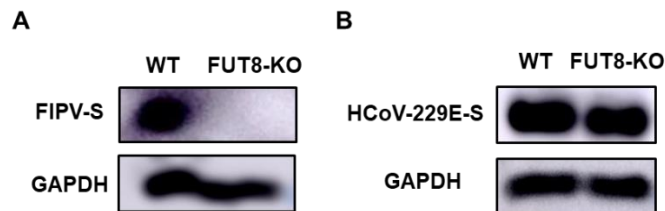


图 4-23 FUT8 敲除对 FIPV 和 HCoV-229E S 蛋白的影响

Fig. 4-23 Effect of FUT8 knockout on FIPV and HCoV-229E S protein

A: WB 检测 FIPV S 蛋白; B: WB 检测 HCoV-229E S 蛋白

A: WB detects FIPV S protein; B: WB detects HCoV-229E S protein

4.8 FUT8 敲除抑制 SARS-CoV-2 复制的多个阶段

4.8.1 SARS-CoV-2 在 FUT8 敲除细胞上的复制受损

为了验证 FUT8 敲除对于其他冠状病毒的影响，我们在 VeroE6 细胞上构建了 FUT8-KO 细胞系（图 4-24A）并验证了 0.1 MOI SARS-CoV-2 的感染效果，结果表明，FUT8 敲除显著抑制了 SARS-CoV-2 的复制（图 4-24B、C）。

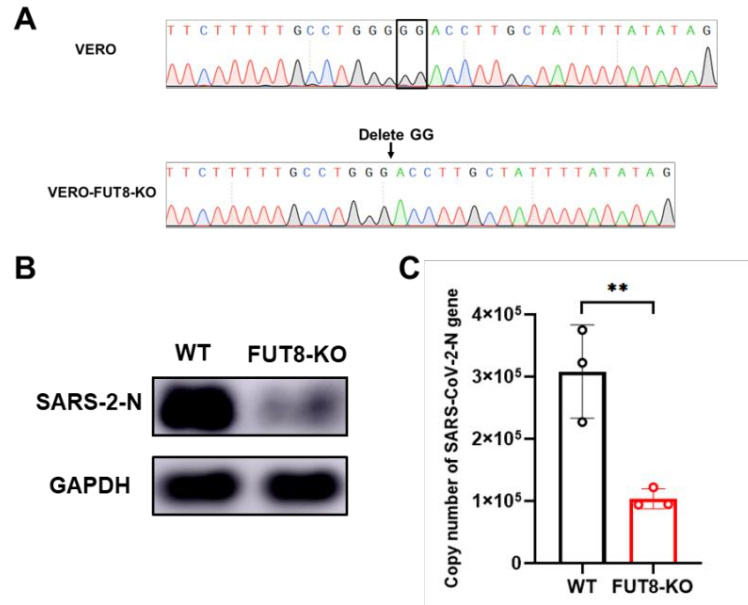


图 4-24 FUT8 敲除抑制 SARS-CoV-2 的复制

Fig. 4-24 FUT8 knockout does not affect the replication of HCoV-229E

A: 构建 Vero-FUT8-KO 细胞系; B: WB 检测 SARS-CoV-2 病毒量; C: SARS-CoV-2 上清病毒拷贝数

A: Construction of Vero-FUT8-KO cell line; B: WB analysis the viral load of SARS-CoV-2;

C: The copy number of SARS-CoV-2 in supernatant

4.8.2 SARS-CoV-2 在 FUT8 敲除细胞上的入侵和 S 蛋白表达受损

为了探究 SARS-CoV-2 在 FUT8-KO 细胞系中复制的受损阶段，我们在 HEK293T 细胞和 HEK293T-FUT8-KO 细胞上表达了 SARS-CoV-2 S 基因并进行了膜融合实验，结果表明（图 4-25A）SARS-CoV-2 S 蛋白在 FUT8-KO 细胞上的入侵受损。接下来我们在 HEK293T 野生型和 FUT8-KO 细胞上表达了 SARS-CoV-2 S 基因并与过表达了 ACE2 的 HEK293T 细胞进行了膜融合实验，结果表明 SARS-CoV-2 在 FUT8-KO 细胞上 S 蛋白表达受损（图 4-25B、C）。综上所述，FUT8 敲除抑制了 SARS-CoV-2 的入侵和 S 蛋白表达。

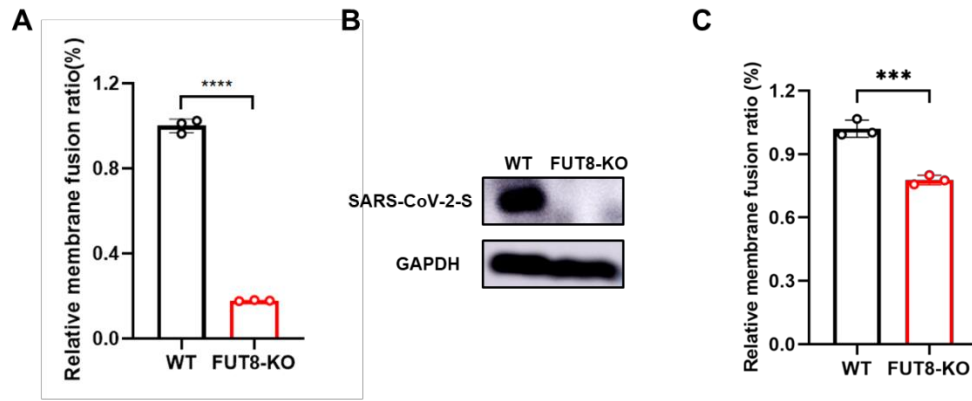


图 4-25 FUT8-KO 抑制 SARS-CoV-2 的入侵和 S 蛋白表达

Fig. 4-25 FUT8 knockout inhibits SARS-CoV-2 invasion and S protein expression

A: SARS-CoV-2 S 蛋白在 FUT8-KO 细胞上的入侵受损; B: SARS-CoV-2 S 表达量;

C: 反向膜融合实验证明 SARS-CoV-2 S 蛋白受损

A: Invasion of SARS-CoV-2 S protein on FUT8-KO cells is impaired; B: Expression of SARS-CoV-2;

C: Reverse membrane fusion assays demonstrated that the SARS-CoV-2 S protein is impaired

5 讨论

从轻度的呼吸道感染到严重急性呼吸系统综合征，冠状病毒可引起多种人类与畜禽的疾病，探索多种冠状病毒共有的宿主因子可以促进开发针对当前和未来冠状病毒大流行的疗法。

5.1 宿主因子在冠状病毒家族复制过程中具有广谱的调控作用

随着多种冠状病毒在全球范围内的流行，开发能够针对冠状病毒家族多个成员的抗病毒治疗方案迫在眉睫。冠状病毒家族的成员之间存在多个高度保守的位点(Chan 2020; Wang et al 2021b)。病毒感染需要许多宿主因子的参与，而由于冠状病毒家族的保守性，这些宿主因子往往会在多种冠状病毒的复制中发挥作用。

随着宿主全基因组筛选技术的不断发展，研究人员不断地发掘出多种冠状病毒共有的宿主因子和通路。如跨膜蛋白 41B(transmembrane protein 41B, TMEM41B)是 SARS-CoV-2 和三种 HCoV 以及公共卫生高度关注的几种黄病毒感染所需的关键宿主因子(Hoffmann et al 2021; Schneider et al 2021)。而半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶 caspase-6 通过切割冠状病毒核衣壳蛋白来产生作为干扰素拮抗剂的片段，从而促进 SARS-CoV-2、MERS-CoV 和 SARS-CoV 的复制(Chu et al 2022)。此外，一项使用 Huh7.5.1-ACE2-IRES-TMPRSS2 细胞的筛选证实磷脂酰肌醇磷酸的生物合成和胆固醇稳态是支持 SARS-CoV-2、HCoV-229E 和 HCoV-OC43 三种冠状病毒感染的关键宿主途径(Wang et al 2021a)。

本实验室前期使用全基因组 CRISPR/Cas9 敲除文库在猪胚胎肾细胞(PK-15)上进行了 TGEV 宿主因子的筛选，鉴定了多个影响 TGEV 复制的关键宿主因子(Sun et al 2021)。FUT8 基因的 9 条备选 sgRNA 在前期 sgRNA 文库筛选中均被筛选到，且在小库筛选中排名第一。在进一步验证后我们发现 FUT8 基因敲除显著抑制 TGEV、FIPV 和 SARS-CoV-2 的复制，因此我们确定 FUT8 是多种冠状病毒复制所必须的宿主因子。鉴定宿主蛋白中保守的交叉反应表位有助于我们研究泛冠状病毒抗病毒策略，以预防当前流行或新发再发的冠状病毒。

5.2 病毒受体糖基化修饰对病毒复制的影响

FUT8 将来自 GDP- β -L-岩藻糖 (GDP-Fuc) 的 L-岩藻糖转移到 N-聚糖的最内层

GlcNAc 上, 形成 α -1,6 键的过程被称为核心岩藻糖基化(Bastian et al 2021)。目前已有多项研究报道宿主细胞的 N-糖基化在病毒入侵过程中必不可少。pAPN 中与 Asn736 连接的 N-聚糖在犬科动物和猫科动物的 APN 中也是保守的, 而人 APN 中缺乏这种聚糖(Reguera et al 2012)。有研究显示, 在人 APN(不能介导 CCoV 的感染)的 N739 位引入 N-聚糖会使细胞对 CCoV-HuPn-2018-spike 介导的入侵敏感, 且去除 CCoV-HuPn-2018 的主要受体犬 APN 的 N747 位的 N-聚糖会严重抑制 CCoV-HuPn-2018 的入侵(Tortorici et al 2022)。也有研究证明宿主受体上的岩藻糖对于病毒的入侵不可或缺, 轮状病毒受体组织血型抗原(histo-blood group antigens, HBGA)上的岩藻糖参与人类轮状病毒 DS-1 和 RV-3 对细胞的入侵(Böhm et al 2015)。还有研究表明, HCV 等病毒会诱导 FUT8 表达量的异常上调从而通过核心岩藻糖基化-EGFR-JAK1-STAT3-RIG-I 信号抑制宿主抗病毒干扰素 (IFN) -I 反应(Pan et al 2024)。

本研究首次发现并验证了 pAPN N736 位点核心岩藻糖基化对于 TGEV 入侵的重要性, 并推广到以 APN 为受体的 (对应犬 cAPN N747 位点、猫 fAPN N740 位点) FIPV 和 CCoV 中。目前为止, pAPN N736 与 fAPN N740 位点上的具体糖基化结构尚未解出, 本研究也为 APN 关键糖基化位点的进一步解析提供了参考。

5.3 病毒膜蛋白的糖基化修饰影响其稳定性

蛋白质糖基化最关键的作用之一是其对糖蛋白折叠、结构、分选、运输和稳定性的影响(Watanabe et al 2019), 以 N-糖基化为例的糖基化修饰从本质上增强了蛋白溶解度和折叠能力(Hebert et al 2014)。N-聚糖还可以通过使用糖蛋白稳态或“糖蛋白凝滞”网络来增强糖蛋白折叠, 该网络由许多聚糖结合和/或修饰酶或蛋白质组成, 这些酶或蛋白质合成、转移、塑造和使用 N-聚糖来指导折叠和运输(Wormald and Dwek 1999)。黄病毒 E 蛋白的 N-糖基化在 E 蛋白折叠、病毒颗粒的组装和释放过程中发挥了重要的作用(Ishida et al 2023)。同时有研究表明, 去除 SARS-CoV-2 S 蛋白上的两个位点 (N331 和 N343) 的 N-糖基化后, 其传染性降低了 1200 倍 (相对传染性降低至 0.083%) (Zong et al 2021)。对几种病毒糖蛋白的单个 N-连接糖基化位点敲除的全面诱变研究, 已经证明它们依赖于宿主的翻译及糖基化修饰机制来正确折叠蛋白质以产生感染性(Mayr et al 2018)。本研究发现, 核心岩藻糖基化的缺失严重影响了 TGEV S 蛋白的表达, 该结果有助于进一步了解冠状病毒 S 蛋白糖基化对其

结构和功能的影响，但其影响蛋白质翻译折叠的具体机制还有待进一步研究。

5.4 核心岩藻糖基化影响 SARS-CoV-2 感染的机制探究

多种病毒和它们的受体上都存在大量的核心岩藻糖基化位点，核心岩藻糖基化参与了这些病毒复制过程中的不同阶段。有研究表明，降低 HBV 的受体牛磺胆酸钠共转运多肽(taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP)的核心岩藻糖基化水平会显著抑制 HBV 的感染(Takamatsu et al 2016)。另一项研究分析了两个位于 SARS-CoV-2 S1 RBD 上,且在病毒感染过程中至关重要的糖基化位点 N331 和 N343,分析结果显示两个位点都存在复杂的核心岩藻糖基化 N-聚糖(Antonopoulos et al 2021)。我们的研究结果显示，SARS-CoV-2 在 FUT8 敲除细胞上的复制受到了显著抑制。膜融合的结果证明，核心岩藻糖基化的缺失会影响 ACE2 的功能，这可能是由于病毒入侵所需的关键糖基化位点的受损导致的（如 N331 和 N343 位点）。反向膜融合实验的结果则表明，FUT8 敲除会影响 SARS-CoV-2 S 蛋白的正常表达。这也为探究核心岩藻糖基化在 SARS-CoV-2 的复制过程中发挥的作用提供了参考，有助于进一步解析糖基化修饰在冠状病毒复制过程中发挥的作用。

5.5 宿主因子抑制剂抗病毒应用前景

阻断 TMPRSS2 活性的丝氨酸蛋白酶抑制剂甲磺酸卡莫司他(Zhou et al 2015)已在日本被批准用于治疗相关的适应症，而一项在人肺腺癌细胞 Calu-3 上进行的研究表明，SARS-CoV-2 在 Calu-3 细胞上的感染会被甲磺酸卡莫司他抑制(Hoffmann et al 2020)。同时另一项在 K18-hACE2 小鼠模型中进行的研究显示，TMPRSS2 的一种小分子蛋白酶抑制剂 N-0385 在体内可完全防止 SARS-CoV-2 诱导的死亡，并且在感染后还提供了针对体重减轻、肺部病变和病毒感染的实质性保护(Shapira et al 2022)。用半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶 caspase-6 特异性抑制剂 z-VEID-fmk 可以显著抑制 SARS-CoV-2 等冠状病毒的复制(Chu et al 2022)。值得一提的是，前文提到的磷脂酰肌醇磷酸抑制剂和胆固醇稳态调节剂在针对抑制 SARS-CoV-2 复制的化合物筛选中被筛选到(Riva et al 2020)。

本研究中使用的岩藻糖基化抑制剂 2PF 可以抑制 FUT 家族所有成员的岩藻糖基化功能。我们分别敲除了 FUT 家族的其他成员 FUT1-13，结果显示 FUT 家族其他成员对于 TGEV 复制的影响均没有 FUT8 显著。而综合 2PF 对于 TGEV 复制的显著

抑制作用,我们认为对于核心岩藻糖基化的抑制是 2PF 抑制 TGEV 复制的主要原因。有研究表明, 2PF 可以抑制神经胶质瘤细胞的岩藻糖基化, 增强神经胶质瘤治疗药物替莫唑胺(temozolomide, TMZ)对神经胶质瘤细胞的毒性, 并降低细胞对 TMZ 治疗的耐药性(Wei et al 2021)。目前尚无 2PF 在抗病毒感染中的应用。而在本研究中, 我们发现 FUT8 抑制剂 2PF 在体外条件下显著抑制了 TGEV 的复制, 这也证明了 FUT8 抑制剂存在作为潜在抗冠状病毒的药物的可能性。然而, 要想将其应用于临床还需要更多的工作, 例如设计对感染组织具有高效率、低毒性和更高的特异性的小分子化合物。

6 结论

1、证明 FUT8 是 TGEV 复制所必需的关键宿主因子，且 FUT8 对于 TGEV 复制的调控作用依赖于其酶活。

2、证明 TGEV 在 FUT8-KO 细胞内的入侵而不是复制阶段受到了严重抑制，且 TGEV 受体 pAPN N736 位点的核心岩藻糖基化参与 TGEV 的复制，并将这一结论推广到使用 APN 作为受体的 FIPV 中。同时还发现 FUT8 敲除影响 TGEV S 蛋白正常表达从而抑制病毒粒子的形成。

3、验证了 FUT8 敲除对 SARS-CoV-2 复制的抑制效果，且发现 FUT8 敲除抑制 SARS-CoV-2 的入侵阶段和 S 蛋白的表达。

综上所述，本研究证明了宿主因子 FUT8 及其酶活在多种冠状病毒感染中的重要性且探究了其作用机制，为新型抗冠状病毒药物的开发和抗病育种提供了新思路。

参考文献

1. Antonopoulos A, Broome S, Sharov V, Ziegenfuss C, Easton RL, Panico M, Dell A, Morris HR, Haslam SM. Site-specific characterization of SARS-CoV-2 spike glycoprotein receptor-binding domain. *Glycobiology*, 2021, 31:181-187
2. Bastian K, Scott E, Elliott DJ, Munkley J. FUT8 Alpha-(1,6)-Fucosyltransferase in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22:(1):455
3. Behren S, Yu J, Pett C, Schorlemer M, Heine V, Fischöder T, Elling L, Westerlind U. Fucose Binding Motifs on Mucin Core Glycopeptides Impact Bacterial Lectin Recognition. *Angewandte Chemie (International Ed. In English)*, 2023, 62: e202302437
4. Biering SB, Sarnik SA, Wang E, Zengel JR, Leist SR, Schäfer A, Sathyan V, Hawkins P, Okuda K, Tau C, Jangid AR, Duffy CV, Wei J, Gilmore RC, Alfajaro MM, Strine MS, Nguyenla X, Van Dis E, Catamura C, Yamashiro LH, Belk JA, Begeman A, Stark JC, Shon DJ, Fox DM, Ezzatpour S, Huang E, Olegario N, Rustagi A, Volmer AS, Livraghi-Butrico A, Wehri E, Behringer RR, Cheon D-J, Schaletzky J, Aguilar HC, Puschnik AS, Button B, Pinsky BA, Blish CA, Baric RS, O'Neal WK, Bertozzi CR, Wilen CB, Boucher RC, Carette JE, Stanley SA, Harris E, Konermann S, Hsu PD. Genome-wide bidirectional CRISPR screens identify mucins as host factors modulating SARS-CoV-2 infection. *Nature Genetics*, 2022, 54: 1078-1089
5. Böhm R, Fleming FE, Maggioni A, Dang VT, Holloway G, Coulson BS, von Itzstein M, Haselhorst T. Revisiting the role of histo-blood group antigens in rotavirus host-cell invasion. *Nature Communications*, 2015, 6: 5907
6. Breitling J, Aeby M. N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, 2013, 5: a013359
7. Burkard C, Verheije MH, Wicht O, van Kasteren SI, van Kuppeveld FJ, Haagmans BL, Pelkmans L, Rottier PJM, Bosch BJ, de Haan CAM. Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner. *PLoS Pathogens*, 2014, 10: e1004502
8. Cantero-Recasens G, Burbulla C, Ohkawa Y, Fukuda T, Harada Y, Curwin AJ,

- Brouwers N, Thun GA, Gu J, Gut I, Taniguchi N, Malhotra V. The ulcerative colitis-associated gene FUT8 regulates the quantity and quality of secreted mucins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119: e2205277119
9. Casas-Sanchez A, Romero-Ramirez A, Hargreaves E, Ellis CC, Grajeda BI, Estevao IL, Patterson EI, Hughes GL, Almeida IC, Zech T, Acosta-Serrano Á. Inhibition of Protein N-Glycosylation Blocks SARS-CoV-2 Infection. *MBio*, 2021, 13: e0371821
10. Cervoni GE, Cheng JJ, Stackhouse KA, Heimbürg-Molinaro J, Cummings RD. O-glycan recognition and function in mice and human cancers. *The Biochemical Journal*, 2020, 477: 1541-1564
11. Chan S-W. Current and Future Direct-Acting Antivirals Against COVID-19. *Frontiers In Microbiology*, 2020, 11: 587944
12. Chen C-Y, Jan Y-H, Juan Y-H, Yang C-J, Huang M-S, Yu C-J, Yang P-C, Hsiao M, Hsu T-L, Wong C-H. Fucosyltransferase 8 as a functional regulator of nonsmall cell lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110: 630-635
13. Cherepanova N, Shrimal S, Gilmore R. N-linked glycosylation and homeostasis of the endoplasmic reticulum. *Current Opinion In Cell Biology*, 2016, 41: 57-65
14. Chu H, Hou Y, Yang D, Wen L, Shuai H, Yoon C, Shi J, Chai Y, Yuen TT-T, Hu B, Li C, Zhao X, Wang Y, Huang X, Lee KS, Luo C, Cai J-P, Poon VK-M, Chan CC-S, Zhang AJ, Yuan S, Sit K-Y, Foo DC-C, Au W-K, Wong KK-Y, Zhou J, Kok K-H, Jin D-Y, Chan JF-W, Yuen K-Y. Coronaviruses exploit a host cysteine-aspartic protease for replication. *Nature*, 2022, 609: 785-792
15. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*, 2013, 339: 819-823
16. Costello DA, Millet JK, Hsia C-Y, Whittaker GR, Daniel S. Single particle assay of coronavirus membrane fusion with proteinaceous receptor-embedded supported bilayers. *Biomaterials*, 2013, 34: 7895-7904
17. Cui J, Li F, Shi Z-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature*

- Reviews. Microbiology*, 2019, 17: 181-192
18. Daniloski Z, Jordan TX, Wessels H-H, Hoagland DA, Kasela S, Legut M, Maniatis S, Mimitou EP, Lu L, Geller E, Danziger O, Rosenberg BR, Phatnani H, Smibert P, Lappalainen T, tenOever BR, Sanjana NE. Identification of Required Host Factors for SARS-CoV-2 Infection in Human Cells. *Cell*, 2021, 184:(1):92-105.e16
 19. Dawood AA. Glycosylation, ligand binding sites and antigenic variations between membrane glycoprotein of COVID-19 and related coronaviruses. *Vacunas*, 2021, 22: 1-9
 20. de Wilde AH, Snijder EJ, Kikkert M, van Hemert MJ. Host Factors in Coronavirus Replication. *Current Topics In Microbiology and Immunology*, 2018, 419:1-42
 21. Delpeut S, Noyce RS, Siu RWC, Richardson CD. Host factors and measles virus replication. *Current Opinion In Virology*, 2012, 2: 773-783
 22. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471: 602-607
 23. Duart G, García-Murria MJ, Grau B, Acosta-Cáceres JM, Martínez-Gil L, Mingarro I. SARS-CoV-2 envelope protein topology in eukaryotic membranes. *Open Biology*, 2020, 10: 200209
 24. Eichler J. Protein glycosylation. *Current Biology : CB*, 2019, 29: R229-R231
 25. Eltahla AA, Luciani F, White PA, Lloyd AR, Bull RA. Inhibitors of the Hepatitis C Virus Polymerase; Mode of Action and Resistance. *Viruses*, 2015, 7: 5206-5224
 26. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods In Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2015, 1282:1-23
 27. Fu Y, Fu Z, Su Z, Li L, Yang Y, Tan Y, Xiang Y, Shi Y, Xie S, Sun L, Peng G. mLST8 is essential for coronavirus replication and regulates its replication through the mTORC1 pathway. *MBio*, 2023, 14: e0089923
 28. Fu Z, Xiang Y, Fu Y, Su Z, Tan Y, Yang M, Yan Y, Baghaei Daemi H, Shi Y, Xie S, Sun L, Peng G. DYRK1A is a multifunctional host factor that regulates coronavirus replication in a kinase-independent manner. *Journal of Virology*, 2024, 98: e0123923
 29. Fujita K, Hatano K, Hashimoto M, Tomiyama E, Miyoshi E, Nonomura N, Uemura

- H. Fucosylation in Urological Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(24):13333
30. Ghosh S, Dellibovi-Ragheb TA, Kerviel A, Pak E, Qiu Q, Fisher M, Takvorian PM, Bleck C, Hsu VW, Fehr AR, Perlman S, Achar SR, Straus MR, Whittaker GR, de Haan CAM, Kehrl J, Altan-Bonnet G, Altan-Bonnet N. β -Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway. *Cell*, 2020, 183(6):1520-1535.e14
31. Gierer S, Bertram S, Kaup F, Wrensch F, Heurich A, Krämer-Kühl A, Welsch K, Winkler M, Meyer B, Drosten C, Dittmer U, von Hahn T, Simmons G, Hofmann H, Pöhlmann S. The spike protein of the emerging betacoronavirus EMC uses a novel coronavirus receptor for entry, can be activated by TMPRSS2, and is targeted by neutralizing antibodies. *Journal of Virology*, 2013, 87: 5502-5511
32. Golay J, Andrea AE, Cattaneo I. Role of Fc Core Fucosylation in the Effector Function of IgG1 Antibodies. *Frontiers In Immunology*, 2022, 13: 929895
33. Gong Y, Qin S, Dai L, Tian Z. The glycosylation in SARS-CoV-2 and its receptor ACE2. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6: 396
34. Goris N, Vandenbussche F, De Clercq K. Potential of antiviral therapy and prophylaxis for controlling RNA viral infections of livestock. *Antiviral Research*, 2008, 78: 170-178
35. Gratz SJ, Cummings AM, Nguyen JN, Hamm DC, Donohue LK, Harrison MM, Wildonger J, O'Connor-Giles KM. Genome engineering of Drosophila with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*, 2013, 194: 1029-1035
36. Gudima G, Kofiadi I, Shilovski I, Kudlay D, Khaitov M. Antiviral Therapy of COVID-19. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24:(10):8867
37. Gupta D, Bhattacharjee O, Mandal D, Sen MK, Dey D, Dasgupta A, Kazi TA, Gupta R, Sinharoy S, Acharya K, Chattopadhyay D, Ravichandiran V, Roy S, Ghosh D. CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life Sciences*, 2019, 232: 116636
38. Gupta R, Gupta D, Ahmed KT, Dey D, Singh R, Swarnakar S, Ravichandiran V, Roy S, Ghosh D. Modification of Cas9, gRNA and PAM: Key to further regulate genome

- editing and its applications. *Progress In Molecular Biology and Translational Science*, 2021, 178: 85-98
39. Guruprasad L. Human coronavirus spike protein-host receptor recognition. *Progress In Biophysics and Molecular Biology*, 2021, 161: 39-53
40. Hebert DN, Lamriben L, Powers ET, Kelly JW. The intrinsic and extrinsic effects of N-linked glycans on glycoproteostasis. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10: 902-910
41. Heinz FX, Stiasny K. Distinguishing features of current COVID-19 vaccines: knowns and unknowns of antigen presentation and modes of action. *NPJ Vaccines*, 2021, 6: 104
42. Hoffmann HH, Schneider WM, Rozen-Gagnon K, Miles LA, Schuster F, Razooky B, Jacobson E, Wu X, Yi S, Rudin CM, MacDonald MR, McMullan LK, Poirier JT, Rice CM. TMEM41B Is a Pan-flavivirus Host Factor. *Cell*, 2021, 184: (1):133-148.e20
43. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu N-H, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 2020, 181:(2):271-280.e8
44. Hou Y, Wang Q. Emerging Highly Virulent Porcine Epidemic Diarrhea Virus: Molecular Mechanisms of Attenuation and Rational Design of Live Attenuated Vaccines. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(21):5478
45. Hulswit RJG, de Haan CAM, Bosch BJ. Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. *Advances In Virus Research*, 2016, 96: 29-57
46. Hurt AC, Chotpitayasunondh T, Cox NJ, Daniels R, Fry AM, Gubareva LV, Hayden FG, Hui DS, Hungnes O, Lackenby A, Lim W, Meijer A, Penn C, Tashiro M, Uyeki TM, Zambon M. Antiviral resistance during the 2009 influenza A H1N1 pandemic: public health, laboratory, and clinical perspectives. *The Lancet. Infectious Diseases*, 2012, 12: 240-248
47. Hussain M, Galvin HD, Haw TY, Nutsford AN, Husain M. Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management. *Infection and Drug Resistance*, 2017, 10: 121-134

48. Iketani S, Mohri H, Culbertson B, Hong SJ, Duan Y, Luck MI, Annavajhala MK, Guo Y, Sheng Z, Uhlemann A-C, Goff SP, Sabo Y, Yang H, Chavez A, Ho DD. Multiple pathways for SARS-CoV-2 resistance to nirmatrelvir. *Nature*, 2023, 613: 558-564
49. Ishida K, Yagi H, Kato Y, Morita E. N-linked glycosylation of flavivirus E protein contributes to viral particle formation. *PLoS Pathogens*, 2023, 19: e1011681
50. Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, 2017, 46: 505-529
51. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 2012, 337: 816-821
52. Joshi G, Borah P, Thakur S, Sharma P, Mayank, Poduri R. Exploring the COVID-19 vaccine candidates against SARS-CoV-2 and its variants: where do we stand and where do we go? *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2021, 17: 4714-4740
53. Jung K, Saif LJ, Wang Q. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): An update on etiology, transmission, pathogenesis, and prevention and control. *Virus Research*, 2020, 286: 198045
54. Kelel M, Yang R-B, Tsai T-F, Liang P-H, Wu F-Y, Huang Y-T, Yang M-F, Hsiao Y-P, Wang L-F, Tu C-F, Liu F-T, Lee YL. FUT8 Remodeling of EGFR Regulates Epidermal Keratinocyte Proliferation during Psoriasis Development. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2021, 141: 512-522
55. Kim J, Koo B-K, Yoon K-J. Modeling Host-Virus Interactions in Viral Infectious Diseases Using Stem-Cell-Derived Systems and CRISPR/Cas9 Technology. *Viruses*, 2019, 11(2):124
56. Knoops K, Kikkert M, Worm SHEvd, Zevenhoven-Dobbe JC, van der Meer Y, Koster AJ, Mommaas AM, Snijder EJ. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biology*, 2008, 6: e226
57. Krarup A, Truan D, Furmanova-Hollenstein P, Bogaert L, Bouchier P, Bisschop IJM, Widjojoatmodjo MN, Zahn R, Schuitemaker H, McLellan JS, Langedijk JPM. A highly stable prefusion RSV F vaccine derived from structural analysis of the fusion

- mechanism. *Nat Commun*, 2015, 6: 8143
58. Kumar N, Sharma S, Kumar R, Tripathi BN, Barua S, Ly H, Rouse BT. Host-Directed Antiviral Therapy. *Clinical Microbiology Reviews*, 2020, 33:
59. Kumar R, Khandelwal N, Thachamvally R, Tripathi BN, Barua S, Kashyap SK, Maherchandani S, Kumar N. Role of MAPK/MNK1 signaling in virus replication. *Virus Research*, 2018, 253: 48-61
60. Lamkiewicz K, Esquivel Gomez LR, Kühnert D, Marz M. Genome Structure, Life Cycle, and Taxonomy of Coronaviruses and the Evolution of SARS-CoV-2. *Current Topics In Microbiology and Immunology*, 2023, 439: 305-339
61. Lasswitz L, Zapatero-Belinchón FJ, Moeller R, Hülskötter K, Laurent T, Carlson L-A, Goffinet C, Simmons G, Baumgärtner W, Gerold G. The Tetraspanin CD81 Is a Host Factor for Chikungunya Virus Replication. *MBio*, 2022, 13: e0073122
62. Li B, Clohisey SM, Chia BS, Wang B, Cui A, Eisenhaure T, Schweitzer LD, Hoover P, Parkinson NJ, Nachshon A, Smith N, Regan T, Farr D, Gutmann MU, Bukhari SI, Law A, Sangesland M, Gat-Viks I, Digard P, Vasudevan S, Lingwood D, Dockrell DH, Doench JG, Baillie JK, Hacohen N. Genome-wide CRISPR screen identifies host dependency factors for influenza A virus infection. *Nature Communications*, 2020, 11: 164
63. Li F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual Review of Virology*, 2016, 3: 237-261
64. Lin H, Wang D, Wu T, Dong C, Shen N, Sun Y, Sun Y, Xie H, Wang N, Shan L. Blocking core fucosylation of TGF- β 1 receptors downregulates their functions and attenuates the epithelial-mesenchymal transition of renal tubular cells. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 2011, 300: F1017-F1025
65. Lin L, Wang X, Chen Z, Deng T, Yan Y, Dong W, Huang Y, Zhou J. TRIM21 restricts influenza A virus replication by ubiquitination-dependent degradation of M1. *PLoS Pathogens*, 2023, 19: e1011472
66. Lu S, Ye Q, Singh D, Cao Y, Diedrich JK, Yates JR, Villa E, Cleveland DW, Corbett KD. The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein. *Nature*

- Communications*, 2021, 12: 502
67. Majumdar P, Niyogi S. ORF3a mutation associated with higher mortality rate in SARS-CoV-2 infection. *Epidemiology and Infection*, 2020, 148: e262
 68. Mayr J, Lau K, Lai JCC, Gagarinov IA, Shi Y, McAtamney S, Chan RWY, Nicholls J, von Itzstein M, Haselhorst T. Unravelling the Role of O-glycans in Influenza A Virus Infection. *Scientific Reports*, 2018, 8: 16382
 69. Mazzarella L, Santoro F, Ravasio R, Fumagalli V, Massa PE, Rodighiero S, Gavilán E, Romanenghi M, Duso BA, Bonetti E, Manganaro L, Pallavi R, Trastulli D, Pallavicini I, Gentile C, Monzani S, Leonardi T, Pasqualato S, Buttinelli G, Di Martino A, Fedele G, Schiavoni I, Stefanelli P, Meroni G, de Francesco R, Steinkuhler C, Fossati G, Iannaccone M, Minucci S, Pelicci PG. Inhibition of the lysine demethylase LSD1 modulates the balance between inflammatory and antiviral responses against coronaviruses. *Science Signaling*, 2023, 16: eade0326
 70. McKean N, Chircop C. Guillain-Barré syndrome after COVID-19 vaccination. *BMJ Case Reports*, 2021, 14:(7):e244125
 71. Mehta PR, Apap Mangion S, Bengner M, Stanton BR, Czuprynska J, Arya R, Sztrihá LK. Cerebral venous sinus thrombosis and thrombocytopenia after COVID-19 vaccination - A report of two UK cases. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2021, 95: 514-517
 72. Millet JK, Jaimes JA, Whittaker GR. Molecular diversity of coronavirus host cell entry receptors. *FEMS Microbiology Reviews*, 2021, 45:(3):fuaa057
 73. Miyoshi E, Moriwaki K, Nakagawa T. Biological function of fucosylation in cancer biology. *Journal of Biochemistry*, 2008, 143: 725-729
 74. Norton PA, Mehta AS. Expression of genes that control core fucosylation in hepatocellular carcinoma: Systematic review. *World Journal of Gastroenterology*, 2019, 25: 2947-2960
 75. Pahmeier F, Lavacca T-M, Goellner S, Neufeldt CJ, Prasad V, Cerikan B, Rajasekharan S, Mizzon G, Haselmann U, Funaya C, Scaturro P, Cortese M, Bartenschlager R. Identification of host dependency factors involved in SARS-CoV-2 replication organelle formation through proteomics and ultrastructural analysis.

Journal of Virology, 2023, 97: e0087823

76. Pan Q, Xie Y, Zhang Y, Guo X, Wang J, Liu M, Zhang X-L. EGFR core fucosylation, induced by hepatitis C virus, promotes TRIM40-mediated-RIG-I ubiquitination and suppresses interferon-I antiviral defenses. *Nature Communications*, 2024, 15: 652
77. Perwitasari O, Yan X, Johnson S, White C, Brooks P, Tompkins SM, Tripp RA. Targeting organic anion transporter 3 with probenecid as a novel anti-influenza a virus strategy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57: 475-483
78. Pichlmair A, Kandasamy K, Alvisi G, Mulhern O, Sacco R, Habjan M, Binder M, Stefanovic A, Eberle C-A, Goncalves A, Bürckstümmer T, Müller AC, Fauster A, Holze C, Lindsten K, Goodbourn S, Kochs G, Weber F, Bartenschlager R, Bowie AG, Bennett KL, Colinge J, Superti-Furga G. Viral immune modulators perturb the human molecular network by common and unique strategies. *Nature*, 2012, 487: 486-490
79. Prydz K, Saraste J. The life cycle and enigmatic egress of coronaviruses. *Molecular Microbiology*, 2022, 117: 1308-1316
80. Rebendenne A, Roy P, Bonaventure B, Chaves Valadão AL, Desmarets L, Arnaud-Arnould M, Rouillé Y, Tauziet M, Giovannini D, Touhami J, Lee Y, DeWeirdt P, Hegde M, Urbach S, Koulali KE, de Gracia FG, McKellar J, Dubuisson J, Wencker M, Belouzard S, Moncorgé O, Doench JG, Goujon C. Bidirectional genome-wide CRISPR screens reveal host factors regulating SARS-CoV-2, MERS-CoV and seasonal HCoVs. *Nature Genetics*, 2022, 54: 1090-1102
81. Reguera J, Santiago C, Mudgal G, Ordoño D, Enjuanes L, Casasnovas JM. Structural bases of coronavirus attachment to host aminopeptidase N and its inhibition by neutralizing antibodies. *PLoS Pathogens*, 2012, 8: e1002859
82. Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nature Reviews. Nephrology*, 2019, 15: 346-366
83. Riva L, Yuan S, Yin X, Martin-Sancho L, Matsunaga N, Pache L, Burgstaller-Muehlbacher S, De Jesus PD, Teriete P, Hull MV, Chang MW, Chan JF-W, Cao J, Poon VK-M, Herbert KM, Cheng K, Nguyen T-TH, Rubanov A, Pu Y, Nguyen C, Choi A, Rathnasinghe R, Schotsaert M, Miorin L, Dejosez M, Zwaka TP, Sit K-Y, Martinez-Sobrido L, Liu W-C, White KM, Chapman ME, Lendy EK,

- Glynn RJ, Albrecht R, Ruppin E, Mesecar AD, Johnson JR, Benner C, Sun R, Schultz PG, Su AI, García-Sastre A, Chatterjee AK, Yuen K-Y, Chanda SK. Discovery of SARS-CoV-2 antiviral drugs through large-scale compound repurposing. *Nature*, 2020, 586: 113-119
84. Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, Wilson IA, Dwek RA. Glycosylation and the immune system. *Science (New York, N.Y.)*, 2001, 291: 2370-2376
85. Sainz B, Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, Yu X, Chayama K, Alrefai WA, Uprichard SL. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nature Medicine*, 2012, 18: 281-285
86. Schjoldager KT, Clausen H, Hurtado-Guerrero R. A Bump-and-Hole Approach to Dissect Regulation of Protein O-Glycosylation. *Molecular Cell*, 2020, 78: 803-805
87. Schneider M, Al-Shareffi E, Haltiwanger RS. Biological functions of fucose in mammals. *Glycobiology*, 2017, 27: 601-618
88. Schneider WM, Luna JM, Hoffmann HH, Sánchez-Rivera FJ, Leal AA, Ashbrook AW, Le Pen J, Ricardo-Lax I, Michailidis E, Peace A, Stenzel AF, Lowe SW, MacDonald MR, Rice CM, Poirier JT. Genome-Scale Identification of SARS-CoV-2 and Pan-coronavirus Host Factor Networks. *Cell*, 2021, 184:(1):120-132.e14
89. Shapira T, Monreal IA, Dion SP, Buchholz DW, Imbiakha B, Olmstead AD, Jager M, Désilets A, Gao G, Martins M, Vandal T, Thompson CAH, Chin A, Rees WD, Steiner T, Nabi IR, Marsault E, Sahler J, Diel DG, Van de Walle GR, August A, Whittaker GR, Boudreault P-L, Leduc R, Aguilar HC, Jean F. A TMPRSS2 inhibitor acts as a pan-SARS-CoV-2 prophylactic and therapeutic. *Nature*, 2022, 605: 340-348
90. Shi M, Nan X-R, Liu B-Q. The Multifaceted Role of FUT8 in Tumorigenesis: From Pathways to Potential Clinical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25:(2):1068
91. Shimabukuro T, Nair N. Allergic Reactions Including Anaphylaxis After Receipt of the First Dose of Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine. *JAMA*, 2021, 325: 780-781
92. Smith EC, Blanc H, Surdel MC, Vignuzzi M, Denison MR. Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: evidence for

- p>proofreading and potential therapeutics.
- PLoS Pathogens*
- , 2013, 9: e1003565
93. Snijder EJ, Limpens RWAL, de Wilde AH, de Jong AWM, Zevenhoven-Dobbe JC, Maier HJ, Faas FFGA, Koster AJ, Bárcena M. A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis. *PLoS Biology*, 2020, 18: e3000715
 94. Song D, Zhao Y, Sun Y, Liang Y, Chen R, Wen Y, Wu R, Zhao Q, Du S, Yan Q, Han X, Cao S, Huang X. HSP90AB1 Is a Host Factor Required for Transmissible Gastroenteritis Virus Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24:(21):15971
 95. Spillings BL, Day CJ, Garcia-Minambres A, Aggarwal A, Condon ND, Haselhorst T, Purcell DFJ, Turville SG, Stow JL, Jennings MP, Mak J. Host glycocalyx captures HIV proximal to the cell surface via oligomannose-GlcNAc glycan-glycan interactions to support viral entry. *Cell Reports*, 2022, 38: 110296
 96. Sun L, Zhao C, Fu Z, Fu Y, Su Z, Li Y, Zhou Y, Tan Y, Li J, Xiang Y, Nie X, Zhang J, Liu F, Zhao S, Xie S, Peng G. Genome-scale CRISPR screen identifies TMEM41B as a multi-function host factor required for coronavirus replication. *PLoS Pathogens*, 2021, 17: e1010113
 97. Takahashi M, Kuroki Y, Ohtsubo K, Taniguchi N. Core fucose and bisecting GlcNAc, the direct modifiers of the N-glycan core: their functions and target proteins. *Carbohydrate Research*, 2009, 344: 1387-1390
 98. Takahashi T, Ikeda Y, Tateishi A, Yamaguchi Y, Ishikawa M, Taniguchi N. A sequence motif involved in the donor substrate binding by alpha1,6-fucosyltransferase: the role of the conserved arginine residues. *Glycobiology*, 2000, 10: 503-510
 99. Takamatsu S, Shimomura M, Kamada Y, Maeda H, Sobajima T, Hikita H, Iijima M, Okamoto Y, Misaki R, Fujiyama K, Nagamori S, Kanai Y, Takehara T, Ueda K, Kuroda Si, Miyoshi E. Core-fucosylation plays a pivotal role in hepatitis B pseudo virus infection: a possible implication for HBV glycotherapy. *Glycobiology*, 2016, 26: 1180-1189
 100. Tan CW, Valkenburg SA, Poon LLM, Wang L-F. Broad-spectrum pan-genus and pan-family virus vaccines. *Cell Host & Microbe*, 2023, 31: 902-916

101. Tortorici MA, Walls AC, Joshi A, Park Y-J, Eguia RT, Miranda MC, Kepl E, Dosey A, Stevens-Ayers T, Boeckh MJ, Telenti A, Lanzavecchia A, King NP, Corti D, Bloom JD, Veisler D. Structure, receptor recognition, and antigenicity of the human coronavirus CCoV-HuPn-2018 spike glycoprotein. *Cell*, 2022, 185:(13):2279-2291.e17
102. Tu C-F, Wu M-Y, Lin Y-C, Kannagi R, Yang R-B. FUT8 promotes breast cancer cell invasiveness by remodeling TGF- β receptor core fucosylation. *Breast Cancer Research : BCR*, 2017, 19: 111
103. Tusell SM, Schittone SA, Holmes KV. Mutational analysis of aminopeptidase N, a receptor for several group 1 coronaviruses, identifies key determinants of viral host range. *Journal of Virology*, 2007, 81: 1261-1273
104. V'Kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews. Microbiology*, 2021, 19: 155-170
105. Venter JC, Smith HO, Adams MD. The Sequence of the Human Genome. *Clinical Chemistry*, 2015, 61: 1207-1208
106. Wallis RS, O'Garra A, Sher A, Wack A. Host-directed immunotherapy of viral and bacterial infections: past, present and future. *Nature Reviews. Immunology*, 2023, 23: 121-133
107. Walls AC, Tortorici MA, Bosch B-J, Frenz B, Rottier PJM, DiMaio F, Rey FA, Veisler D. Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer. *Nature*, 2016, 531: 114-117
108. Wang J, Deng F, Ye G, Dong W, Zheng A, He Q, Peng G. Comparison of lentiviruses pseudotyped with S proteins from coronaviruses and cell tropisms of porcine coronaviruses. *Virologica Sinica*, 2016, 31: 49-56
109. Wang Q, Zhang Y, Wu L, Niu S, Song C, Zhang Z, Lu G, Qiao C, Hu Y, Yuen K-Y, Wang Q, Zhou H, Yan J, Qi J. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell*, 2020, 181:(4):894-904.e9
110. Wang R, Simoneau CR, Kulsuptrakul J, Bouhaddou M, Travisano KA, Hayashi JM, Carlson-Stevermer J, Zengel JR, Richards CM, Fozouni P, Oki J, Rodriguez L,

- Joehnk B, Walcott K, Holden K, Sil A, Carette JE, Krogan NJ, Ott M, Puschnik AS. Genetic Screens Identify Host Factors for SARS-CoV-2 and Common Cold Coronaviruses. *Cell*, 2021a, 184:(1):106-119.e14
- 111.Wang X, Gu J, Miyoshi E, Honke K, Taniguchi N. Phenotype changes of Fut8 knockout mouse: core fucosylation is crucial for the function of growth factor receptor(s). *Methods In Enzymology*, 2006, 417: 11-22
- 112.Wang X, Jin Q, Xiao W, Fang P, Lai L, Xiao S, Wang K, Fang L. Genome-Wide CRISPR/Cas9 Screen Reveals a Role for SLC35A1 in the Adsorption of Porcine Deltacoronavirus. *Journal of Virology*, 2022, 96: e0162622
- 113.Wang X, Xia S, Zhu Y, Lu L, Jiang S. Pan-coronavirus fusion inhibitors as the hope for today and tomorrow. *Protein & Cell*, 2021b, 12: 84-88
- 114.Wardzala CL, Wood AM, Belnap DM, Kramer JR. Mucins Inhibit Coronavirus Infection in a Glycan-Dependent Manner. *ACS Central Science*, 2022, 8: 351-360
- 115.Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science (New York, N.Y.)*, 2020, 369: 330-333
- 116.Watanabe Y, Bowden TA, Wilson IA, Crispin M. Exploitation of glycosylation in enveloped virus pathobiology. *Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects*, 2019, 1863: 1480-1497
- 117.Weber F, Wagner V, Rasmussen SB, Hartmann R, Paludan SR. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *Journal of Virology*, 2006, 80: 5059-5064
- 118.Wei K-C, Lin Y-C, Chen C-H, Chu Y-H, Huang C-Y, Liao W-C, Liu C-H. Fucosyltransferase 8 modulates receptor tyrosine kinase activation and temozolomide resistance in glioblastoma cells. *American Journal of Cancer Research*, 2021, 11: 5472-5484
- 119.Whittaker GR, Daniel S, Millet JK. Coronavirus entry: how we arrived at SARS-CoV-2. *Current Opinion In Virology*, 2021, 47: 113-120
- 120.Wolff G, Limpens RWAL, Zevenhoven-Dobbe JC, Laugks U, Zheng S, de Jong AWM, Koning RI, Agard DA, Grünewald K, Koster AJ, Snijder EJ, Bárcena M. A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle.

- Science (New York, N.Y.)*, 2020, 369: 1395-1398
- 121.Wormald MR, Dwek RA. Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. *Structure (London, England : 1993)*, 1999, 7: R155-R160
- 122.Wu C-H, Chen P-J, Yeh S-H. Nucleocapsid phosphorylation and RNA helicase DDX1 recruitment enables coronavirus transition from discontinuous to continuous transcription. *Cell Host & Microbe*, 2014, 16: 462-472
- 123.Xia B, Zheng L, Li Y, Sun W, Liu Y, Li L, Pang J, Chen J, Li J, Cheng H. The brief overview, antiviral and anti-SARS-CoV-2 activity, quantitative methods, and pharmacokinetics of cepharanthine: a potential small-molecule drug against COVID-19. *Frontiers In Pharmacology*, 2023, 14: 1098972
- 124.Xu R, Shi M, Li J, Song P, Li N. Construction of SARS-CoV-2 Virus-Like Particles by Mammalian Expression System. *Frontiers In Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 862
- 125.Yan Q, Liu X, Sun Y, Zeng W, Li Y, Zhao F, Wu K, Fan S, Zhao M, Chen J, Yi L. Swine Enteric Coronavirus: Diverse Pathogen-Host Interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23:(7):3953
- 126.Yang Q, Hughes TA, Kelkar A, Yu X, Cheng K, Park S, Huang W-C, Lovell JF, Neelamegham S. Inhibition of SARS-CoV-2 viral entry upon blocking N- and O-glycan elaboration. *ELife*, 2020, 9: e61552
- 127.Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics*, 2014, 23: R40-R46
- 128.Zhang X, Hasoksuz M, Spiro D, Halpin R, Wang S, Stollar S, Janies D, Hadya N, Tang Y, Ghedin E, Saif L. Complete genomic sequences, a key residue in the spike protein and deletions in nonstructural protein 3b of US strains of the virulent and attenuated coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *Virology*, 2007, 358: 424-435
- 129.Zhang Y, Zhao W, Mao Y, Chen Y, Wang S, Zhong Y, Su T, Gong M, Du D, Lu X, Cheng J, Yang H. Site-specific N-glycosylation Characterization of Recombinant SARS-CoV-2 Spike Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 2021, 20: 100058

130. Zheng L, Li H, Fu L, Liu S, Yan Q, Leng SX. Blocking cellular N-glycosylation suppresses human cytomegalovirus entry in human fibroblasts. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 138: 103776
131. Zhou Y, Vedantham P, Lu K, Agudelo J, Carrion R, Nunneley JW, Barnard D, Pöhlmann S, McKerrow JH, Renslo AR, Simmons G. Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. *Antiviral Research*, 2015, 116: 76-84
132. Zhou Z, Zhu Y, Chu M. Role of COVID-19 Vaccines in SARS-CoV-2 Variants. *Frontiers In Immunology*, 2022, 13: 898192
133. Zhu M, Lv J, Wang W, Guo R, Zhong C, Antia A, Zeng Q, Li J, Liu Q, Zhou J, Zhu X, Fan B, Ding S, Li B. CMPK2 is a host restriction factor that inhibits infection of multiple coronaviruses in a cell-intrinsic manner. *PLoS Biology*, 2023, 21: e3002039
134. Zhu S, Liu Y, Zhou Z, Zhang Z, Xiao X, Liu Z, Chen A, Dong X, Tian F, Chen S, Xu Y, Wang C, Li Q, Niu X, Pan Q, Du S, Xiao J, Wang J, Wei W. Genome-wide CRISPR activation screen identifies candidate receptors for SARS-CoV-2 entry. *Science China. Life Sciences*, 2022, 65: 701-717
135. Zong G, Li C, Prabhu SK, Zhang R, Zhang X, Wang L-X. A facile chemoenzymatic synthesis of SARS-CoV-2 glycopeptides for probing glycosylation functions. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 2021, 57: 6804-6807