

猪德尔塔冠状病毒 NSP13 蛋白原核表达与解旋活性分析

陶丽寒¹, 吴诚诚², 林翠², 康昭风², 黄建珍^{1*}

1 江西农业大学 动物科学技术学院, 江西 南昌 330045

2 江西省农业科学院畜牧兽医研究所, 江西 南昌 330200

陶丽寒, 吴诚诚, 林翠, 康昭风, 黄建珍. 猪德尔塔冠状病毒 NSP13 蛋白原核表达与解旋活性分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4573-4585.

TAO Lihan, WU Chengcheng, LIN Cui, KANG Zhaofeng, HUANG Jianzhen. Prokaryotic expression and helicase activity analysis of PDCoV NSP13[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4573-4585.

摘要: 猪德尔塔冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)是导致哺乳仔猪致命性腹泻的一种重要病原体, 目前缺少有效防治该病毒的疫苗和药物。非结构蛋白 13 (NSP13)是一种病毒编码的解旋酶, 被认为是抗病毒药物的重要靶点, 因此有必要对其解旋活性进行研究。本研究以 PDCoV 的 NSP13 基因为模板, 将其插入到原核表达载体 pET-28a 中, 构建重组质粒 pET-28a-NSP13。NSP13 蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中成功表达并进行了纯化。验证了 NSP13 蛋白的活性, 并且探究了影响 NSP13 解旋酶活性的因素。结果表明, PDCoV 的 NSP13 蛋白能够在原核系统中表达, 纯化后的 NSP13 具有解旋活性, 能够解开具有 5'tailed 的双链 DNA。此外, NSP13 还具有促进核酸单链的碱基互补配对形成双链的退火功能。金属离子的种类会影响 NSP13 的解旋活性, 但在 0.5–6.0 mmol/L 范围内的 Mg^{2+} 浓度对 NSP13 解旋活性无明显影响。当溶液 pH 在 4–9 范围内, NSP13 解旋活性无明显差异。在 0.25–6.00 mmol/L 范围内的 ATP 浓度对 NSP13 解旋活性存在微弱的影响, NSP13 浓度 ≥ 80 nmol/L 则会抑制解旋活性。本研究获得了重组表达的 PDCoV NSP13 蛋白并对其解旋酶活性进行了探究, 为深入理解 NSP13 调控 PDCoV 复制的机制和抗冠状病毒药物的研发奠定了理论基础。

关键词: 猪德尔塔冠状病毒; 非结构蛋白 13; 解旋活性; 抗病毒药物

资助项目: 江西省自然科学基金(20232BAB215057); 江西农业大学青年创新团队项目(JXAUCXTD007)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20232BAB215057) and the Project of Youth Innovation Team of Jiangxi Agricultural University (JXAUCXTD007).

*Corresponding author. E-mail: huang813813@163.com

Received: 2024-01-14; Accepted: 2024-05-30; Published online: 2024-06-04

Prokaryotic expression and helicase activity analysis of PDCoV NSP13

TAO Lihan¹, WU Chengcheng², LIN Cui², KANG Zhaofeng², HUANG Jianzhen^{1*}

1 College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China

2 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, Jiangxi, China

Abstract: Porcine deltacoronavirus (PDCoV) is a major pathogen causing fatal diarrhea in suckling piglets, and there is currently a lack of effective vaccines and drugs to prevent and control the virus. The nonstructural protein 13 (NSP13) serves as a virus-coded helicase and is considered to be a crucial target for antiviral drugs, making it imperative to investigate the helicase activity of NSP13. In this study, the *NSP13* gene of PDCoV was synthesized and integrated into the prokaryotic expression vector pET-28a to construct the recombinant plasmid pET-28a-NSP13. NSP13 was successfully expressed in BL21 (DE3) and subsequently purified. The study also verified the helicase activity of the purified NSP13 and explored the factors that influence this activity. The results indicated that NSP13 from PDCoV was effectively expressed in the prokaryotic system and exhibited helicase activity, capable of unwinding double-stranded DNA with a tail at the 5' end. Additionally, NSP13 demonstrated an annealing function by promoting the complementary pairing of single-stranded nucleotide chains to form double strands. The helicase activity of NSP13 was affected by metal ions, but Mg^{2+} concentrations in the range of 0.5–6.0 mmol/L had no significant effect on helicase activity of NSP13. When the solution pH was in the range of 4–9, there was no difference in helicase activity. ATP concentrations in the range of 0.25–6.00 mmol/L had a weak effect on helicase activity, and NSP13 concentration ≥ 80 nmol/L inhibited the helicase activity. We obtained the NSP13 of PDCoV and investigated its helicase activity. These findings provided a theoretical foundation for the further research on the regulatory mechanism of NSP13 in PDCoV replication and the development of anti-coronaviral drugs.

Keywords: porcine deltacoronavirus; nonstructural protein 13; helicase activity; antiviral drugs

猪德尔塔冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)是一种新型猪肠道致病性冠状病毒,属于 δ 冠状病毒属的成员,2012年首次在中国香港地区的猪群中发现^[1]。2014年在美国俄亥俄州的腹泻仔猪和母猪粪便中检测到了PDCoV^[2],随后在加拿大、韩国、日本等国家也检测到了PDCoV^[3-5],病毒造成的疾病流行给养猪业造成了巨大的经济损失。PDCoV能够感染猪肠道上

皮细胞,引起肠绒毛明显萎缩,导致哺乳仔猪营养成分和电解质吸收不良,临床表现为急性水样腹泻、呕吐和死亡^[6]。PDCoV还具有跨物种传播的能力,能够感染犊牛、鸡和小鼠^[7-9]。Lednicky等^[10]首次在3名患有急性发热疾病的海地儿童血浆样本中鉴定出PDCoV,凸显了PDCoV在人群中传播的风险。然而,目前尚无有效防治PDCoV的特效药和疫苗。

PDCoV 为单股正链 RNA 病毒, 基因组全长约 25.4 kb, 编码顺序为 5'UTR-ORF1a-ORF1b-S-E-M-NS6-N-NS7-NS7a-3'UTR^[11]。其中开放阅读框 ORF1a 和 ORF1b 位于基因组 5'端, 占整个基因组的 2/3, 编码多聚蛋白 pp1a 和 pp1ab, 多聚蛋白 pp1a 和 pp1ab 进一步被木瓜样蛋白酶和 3C 样蛋白酶水解成 15 个非结构蛋白(NSP2-NSP16)^[12]。其中, 冠状病毒的非结构蛋白 NSP13 源于 3C 样蛋白酶对多聚蛋白 pp1ab 的水解^[13]。

解旋酶是一种广泛存在于自然界几乎所有的生命体中的动力蛋白, 能够利用三磷酸核苷(nucleoside triphosphate, NTP)水解产生的能量进行核酸构象的重塑^[14]。多数病毒利用宿主的解旋酶进行复制, 少数病毒能够直接编码解旋酶。NSP13 是冠状病毒编码的一种解旋酶, 属于解旋酶超级家族 1 (superfamily1, SF1), 被认为是抗冠状病毒药物的理想靶点^[15]。NSP13 作为解旋酶调控病毒复制和转录, 能解开病毒复制过程中产生的双链 RNA, 促进子代病毒 RNA 的生成。目前对冠状病毒 NSP13 蛋白的研究主要源于 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2, 两者的 NSP13 序列只相差 1 个第 570 位的氨基酸(I570V)^[16], 然而关于 PDCoV NSP13 的研究报道较少。

本研究利用大肠杆菌原核表达系统表达了全长的 PDCoV 非结构蛋白 NSP13, 通过 Ni-NTA 亲和层析法进行纯化, 并对纯化出的 NSP13 蛋白进行鉴定和活性验证; 通过探究 PDCoV NSP13 的解旋极性以及影响解旋活性的因素, 发现 PDCoV NSP13 浓度过高会抑制解旋活性, 同时还发现 NSP13 具有促进核酸单链的碱基互补配对形成核酸双链的退火功能。本研究可为进一步深入揭示 NSP13 调控 PDCoV 病毒复制的作用机制, 以及研发以 NSP13 为靶点的抗冠状病毒药物提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株、质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 (DE3)表达感受态细胞为本实验室保存; 从 NCBI 下载 PDCoV 毒株 CH/JXJGS01/P50 的 NSP13 基因序列 (GenBank 登录号: MH025764.1), 由通用生物(安徽)股份有限公司合成目的基因 NSP13 并构建重组质粒 pET-28a-NSP13。

1.1.2 主要试剂

牛血清白蛋白、NaCl、异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)、Tris、EDTA·Na₂·2H₂O 和过硫酸铵(ammonium persulphate, APS)均购自北京兰杰柯科技有限公司, 腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid, HEPES)和 MgCl₂ 均购自国药集团化学试剂有限公司, 焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)、四甲基乙二胺(tetramethylethylenediamine, TEMED)和甘油均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。Bradford 蛋白定量试剂盒和质粒提取试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, His 标签蛋白纯化填料 Ni-NTA agarose 购自北京全式金生物技术股份有限公司, 小鼠抗 His-tag 单克隆抗体和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)羊抗鼠二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.3 底物核酸

四条不同序列的单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA)见表 1, 由北京擎科生物科技有限公司合成。其中, DNA1-FAM 的 5'端标记羧基荧光素(carboxyfluorescein, FAM), DNA2、DNA3 和 DNA4 是 DNA1-FAM 的互补链, 均无荧光标记。

表 1 单链核酸序列

Table 1 Sequences of single-stranded nucleic acid

Names	Sequences (5'→3')	Size (bp)
DNA1-FAM	FAM-GCGACGTCACGTGCA	15
DNA2	CAGCTAGACCTGCACGTGA CGTCGC	25
DNA3	TGCACGTGACGTCGCCCA GATCGAC	25
DNA4	TGCACGTGACGTCGC	15

1.2 方法

1.2.1 重组蛋白 NSP13 的诱导表达

将带有组氨酸标签(His-tag)的重组质粒 pET-28a-NSP13 转入 *E. coli* BL21 (DE3) 表达菌株中, 涂板, 过夜培养。挑取单克隆菌落接种至含有卡那霉素(kanamycin, Kan)的 5 mL LB 液体培养基, 37 °C、220 r/min 培养 12 h, 再将培养物以 1: 100 的比例接种到 LB 液体培养基中扩大培养, 培养至 OD_{600} 为 0.4–0.6 时, 分别加入不同浓度的 IPTG 进行诱导, 16 °C、90 r/min 培养 20 h, 收集菌液并超声破碎, 离心取上清与沉淀样品进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.2 重组蛋白 NSP13 的纯化

根据最适 IPTG 浓度和最适诱导时间进行菌液的扩大培养, 收集菌液离心, 然后用预冷的 PBS 溶液(10 mmol/L NaH_2PO_4 , 140 mmol/L NaCl 和 3 mmol/L KCl, 调节溶液 pH=7.8)重悬菌体, 5 000 r/min 离心 10 min, 重复操作 3 次, 弃上清。用 buffer A (25 mmol/L HEPES-KOH, 10 mmol/L NaCl, 10 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 5 mmol/L MgCl_2 , 7 mmol/L β -巯基乙醇和 1 mmol/L 苯甲磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF), 调节溶液 pH=7.8)重悬菌体, 5 000 r/min 离心 10 min, 再用 buffer B (25 mmol/L HEPES-KOH, 1 mol/L NaCl, 10 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 5 mmol/L MgCl_2 , 1.6 mmol/L 咪唑, 7 mmol/L β -巯基乙醇, 1 mmol/L PMSF 和 30%甘油, 调节溶液 pH=7.8)重悬菌体, 超声裂解菌体后, 12 000 r/min 离心

40 min 收集上清, 用 0.22 μm 针头式滤器过滤上清。采用 Ni-NTA 亲和层析法, 通过含有不同浓度咪唑的 buffer C (25 mmol/L HEPES-KOH, 0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 5 mmol/L MgCl_2 , 7 mmol/L β -巯基乙醇, 1 mmol/L PMSF 和 15%甘油, 调节溶液 pH=7.8)进行洗脱。取流穿液与洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳。加入 store buffer (25 mmol/L HEPES-KOH, 0.1 mol/L NaCl, 1 mmol/L DTT 和 10%甘油, 调节溶液 pH=7.8)超滤离心洗脱的蛋白, Western blotting 联合质谱进行鉴定。使用 Bradford 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 分装成 20 μL /管, 保存在 -80 °C。蛋白纯化和超滤浓缩均在 4 °C 条件下进行。

1.2.3 Western blotting 和质谱鉴定 NSP13

取纯化的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后切胶, 将蛋白转印至硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane, NC), 使用 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次。按说明书稀释小鼠抗 His-tag 单克隆抗体, 加入一抗稀释液 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次。按说明书稀释 HRP 羊抗鼠二抗, 加入二抗稀释液室温平缓摇动 1 h, 使用 TBST 洗膜 3 次。使用增强型化学发光液(enhanced chemiluminescence, ECL)进行显色, 蛋白印迹成像仪曝光获取条带。取纯化的蛋白样品进行 SDS-PAGE, 电泳结束后将目标条带进行质谱鉴定。

1.2.4 核酸底物制备

等摩尔浓度的 2 条核酸单链加入退火缓冲液(50 mmol/L Tris 和 50 mmol/L NaCl, 调节溶液 pH=8.0), 在金属浴中 95 °C 反应 5 min, 自然冷却到室温, 加 DEPC 水稀释到 80 nmol/L, 分装保存在 -20 °C。退火产物进行 Native PAGE 电泳鉴定, 电泳结束后取出胶, 放入 Typhoon RGB 多功能激光扫描仪中进行成像, 通过分

析核酸单链与双链的条带灰度值判断是否退火完全。

1.2.5 重组蛋白 NSP13 的解旋实验

将 50 nmol/L NSP13 与 8 nmol/L 双链核酸底物, 在解旋反应液[30 mmol/L Tris-HCl、0.1 mg/mL BSA、1%甘油、3 mmol/L 金属离子、100 nmol/L 陷阱核酸(Trap)和 2 mmol/L DTT]中混合, 反应起始加入 3 mmol/L ATP。分别加入不同种类金属离子或调节不同的 pH 溶液, 混合体系放入金属浴中, 37 °C 下反应 30 min。其中, Trap 单链与荧光标记的单链序列相同, 能够竞争性结合无荧光标记的互补链, 阻止解开的核酸单链重新退火形成双链。核酸双链在 95 °C 高温变性 5 min 后, 打开成单链作为阳性对照(positive control, PC), 不加 NSP13 的反应作为阴性对照(negative control, NC)。到达反应时间时, 取出 10 μ L 样品加入等体积 2 \times stop buffer (50 mmol/L EDTA \cdot Na₂、1% SDS 和 10%甘油)混匀, 终止解旋反应。混合物加入 Native PAGE 胶中 180 V 电泳 1.5 h, 电泳结束后, 取出胶放入 Typhoon RGB 多功能激光扫描仪中进行成像, ImageJ 分析条带灰度值得到解旋幅度等数据。

1.2.6 PDCoV NSP13 退火实验

取 4 nmol/L 单链 DNA1-FAM 加入反应液 (30 mmol/L Tris-HCl、0.1 mg/mL BSA、1%甘油、3 mmol/L MgCl₂ 和 2 mmol/L DTT)中, 以加入 4 nmol/L 单链 DNA2 作为反应起始, 反应在 37 °C 进行, 反应总体系为 200 μ L。单链 DNA1-FAM 和单链 DNA2 在 95 °C 条件下, 不完全退火的产物作为单链和双链的参照标准(size standards)。分别在不同时间点取 15 μ L 产物加入等体积的 2 \times stop buffer, 混合物进行 Native PAGE, 电泳结束后取出胶放入 Typhoon RGB 多功能激光扫描仪中成像。

2 结果与分析

2.1 PDCoV NSP13 和 SARS-CoV-2 NSP13 核心域的序列差异

采用 ESPrpt 3.0 (<https://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>)对 PDCoV 毒株 CH/JXJGS01/P50 和 SARS-CoV-2 毒株 Wuhan-Hu-1 (GenBank 登录号: NC_045512.2)的 NSP13 蛋白核心域(helicase core)氨基酸序列进行比对, 发现 PDCoV NSP13 和 SARS-CoV-2 NSP13 的核心域序列一致性仅为 52.39%, 推测 PDCoV NSP13 蛋白与 SARS-CoV-2 的 NSP13 蛋白功能可能存在一定差异, 因此仍有必要对 PDCoV NSP13 蛋白进行研究。

2.2 重组蛋白 NSP13 的诱导表达和纯化

重组质粒 pET-28a-NSP13 经过双酶切和测序进行鉴定, 将构建成功的重组质粒 pET-28a-NSP13 转入 *E. coli* BL21 (DE3)表达菌株中, 挑取单菌落接种于 LB 培养液(含 100 mg/L Kan), 37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.4–0.6 时, 加入 IPTG 诱导目的基因表达。收集菌液并进行超声破碎, 取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测。结果显示, 沉淀和上清中都出现与目标蛋白分子量大小一致的特异性条带(约 70 kDa), 说明不同浓度的 IPTG 均能诱导 NSP13 在包涵体中大量表达, 上清中也有少量 NSP13 出现可溶性表达, 而且低浓度 0.1 mmol/L IPTG 诱导能降低蛋白在包涵体中的表达量, 促使 NSP13 在上清中表达(图 1A、1B)。

菌液在 0.1 mmol/L IPTG 诱导下, 16 °C、90 r/min 培养 20 h, 扩大培养至 4 L, 收集菌液后超声破碎, 进行蛋白纯化。带有 His-tag 的重组蛋白 NSP13 经过 Ni-NTA 亲和层析纯化, 收集的流穿液和洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳, 发现 NSP13 (70 kDa)能够被含有 200 mmol/L 咪唑的溶

液洗脱下来(图 1C)。取少许洗脱样品进行 Western blotting 鉴定,发现在 70 kDa 附近存在特异性条带(图 1D)。

2.3 质谱鉴定重组蛋白 PDCoV NSP13

切取 SDS-PAGE 胶中 70 kDa 位置的蛋白凝胶进行质谱鉴定,质谱分析得到 65 个肽段,序列覆盖率达 90.6%。图 2 为其中一条肽段的二级质谱图(*b,y* 离子匹配图),该肽段的氨基酸序列与 PDCoV NSP13 的部分序列完全一致,表

明纯化得到的蛋白为 PDCoV NSP13。

2.4 制备不同末端结构的底物

分别设计带有荧光染料 FAM 标记和无标记的 ssDNA,并通过退火实验制备含有 5'tailed、3'tailed 和 blunt end 这 3 种末端结构的 dsDNA (图 3)。

2.5 PDCoV NSP13 浓度测定和活性验证

使用 Bradford 蛋白定量试剂盒,对纯化并且超滤浓缩后的 NSP13 浓度进行测定,根据图 4A 中

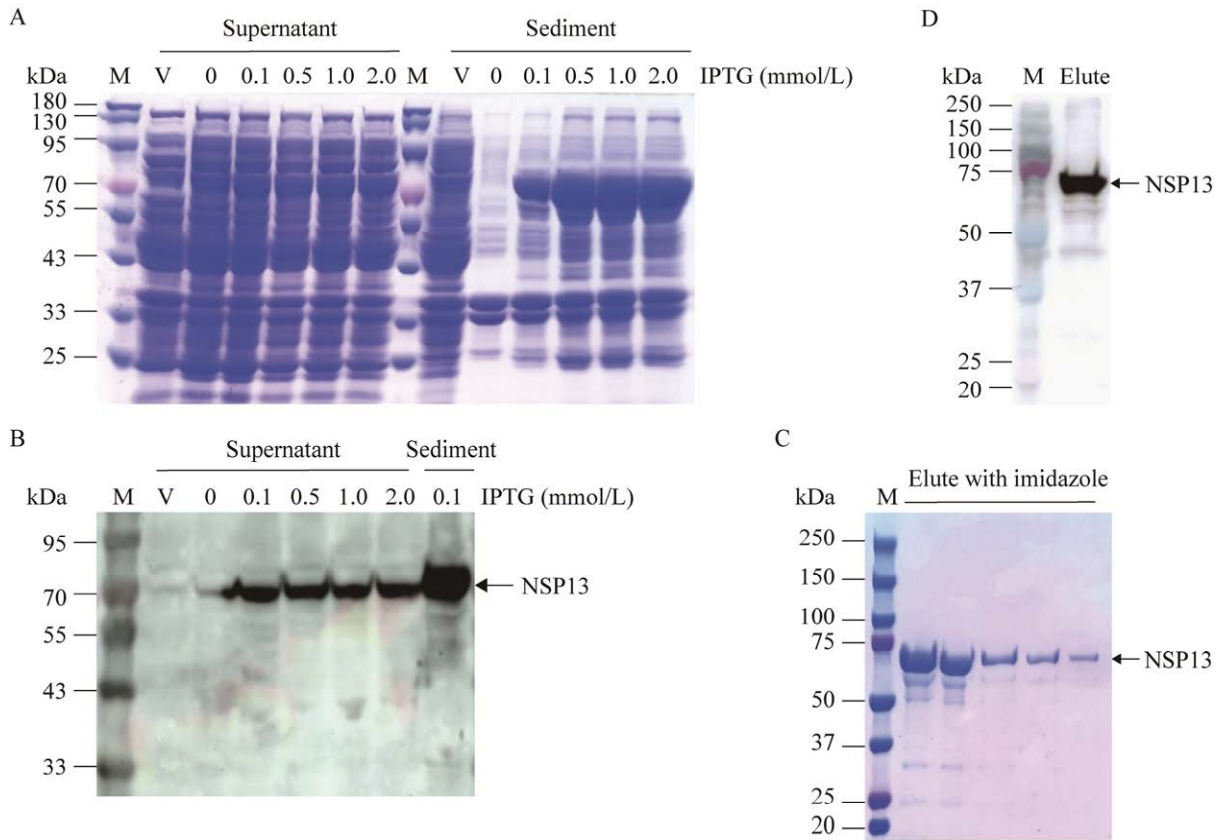


图 1 重组蛋白 NSP13 的表达和纯化 A: 不同浓度 IPTG 诱导蛋白表达结果. B: Western blotting 检测上清和沉淀中 His-NSP13 表达. C: NSP13 在 200 mmol/L 咪唑溶液中洗脱结果. D: Western blotting 鉴定纯化后的目标蛋白 NSP13. 泳道 V 表示含空载体 pET-28a 的菌液; 泳道 M 表示蛋白质分子量标记物

Figure 1 Expression and purification of recombinant protein NSP13. A: Induction of NSP13 expression by different concentrations of IPTG. B: His-NSP13 expression in supernatant and pellet was detected by Western blotting. C: NSP13 in elution fractions of 200 mmol/L imidazole solution. D: The purified target protein NSP13 was detected by Western blotting. Lane V represents the bacterial solution containing the empty vector pET-28a; Lane M represents the protein molecular weight marker.

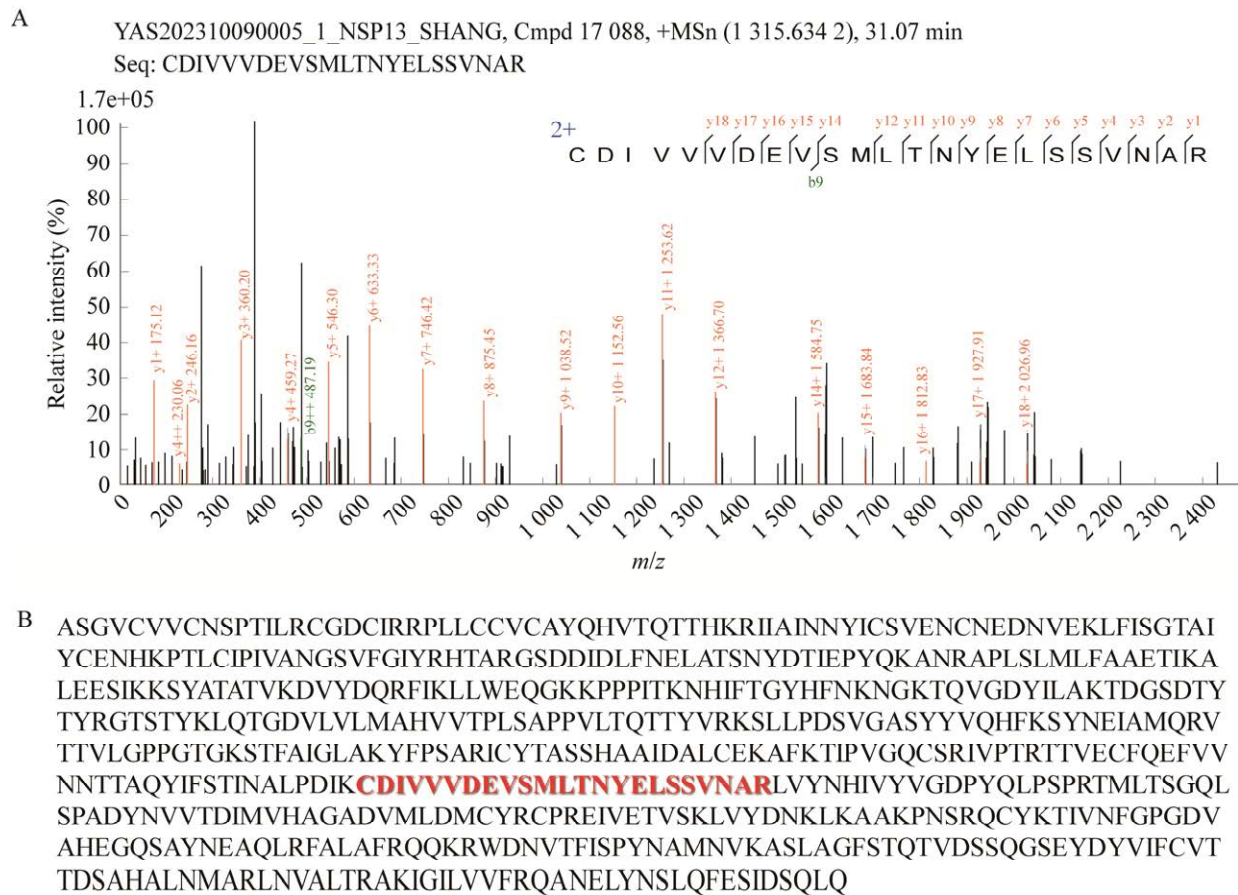


图 2 蛋白质 NSP13 的质谱鉴定 A: 肽段的二级质谱图. B: PDCoV NSP13 氨基酸序列. 红色加粗字体表示 NSP13 序列与肽段序列相同的部分

Figure 2 Identification of NSP13 protein by mass spectrometry. A: Secondary mass spectrum of the peptide. B: The amino acid sequence of the PDCoV NSP13. The red bold font indicates the portion of the NSP13 sequence that is identical to the peptide sequence.

蛋白标准曲线, 将 NSP13 样品的 OD_{595} 值 2.05 代入公式计算, 得到 NSP13 蛋白浓度为 $867.6 \mu\text{g/mL}$, 换算成摩尔浓度为 $12.40 \mu\text{mol/L}$ 。

PDCoV NSP13 是病毒编码的一种解旋酶, 可通过电泳迁移率实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)对 NSP13 进行解旋活性的验证, 设置 95°C 高温变性为阳性对照(PC), 不加 NSP13 作为阴性对照(NC)。解旋产物的电泳结果表明, 纯化得到的 PDCoV NSP13 能够以依赖 ATP 的方式解开 dsDNA, 具有较高的解旋活性(图 4B)。

2.6 PDCoV NSP13 具有 5'→3'解旋极性

为了探究 PDCoV NSP13 在解开底物核酸双链时的解旋极性, 检测了 NSP13 对 3'tailed dsDNA、5'tailed dsDNA 和 blunt end dsDNA 的解旋反应, 发现 5'tailed dsDNA 的解旋幅度为 $A_{(5' \text{tailed})} = 0.77 \pm 0.03$, 而 3'tailed dsDNA 和 blunt end dsDNA 解旋幅度接近于零, 分别为 $A_{(3' \text{tailed})} = 0.02 \pm 0.01$ 和 $A_{(\text{blunt end})} = 0.01 \pm 0.00$ (图 5)。结果显示 PDCoV NSP13 只能解开含有 5'tailed dsDNA, 不能解开 3'tailed dsDNA 和 blunt end dsDNA, 说明 NSP13 是采用移位解旋的方式

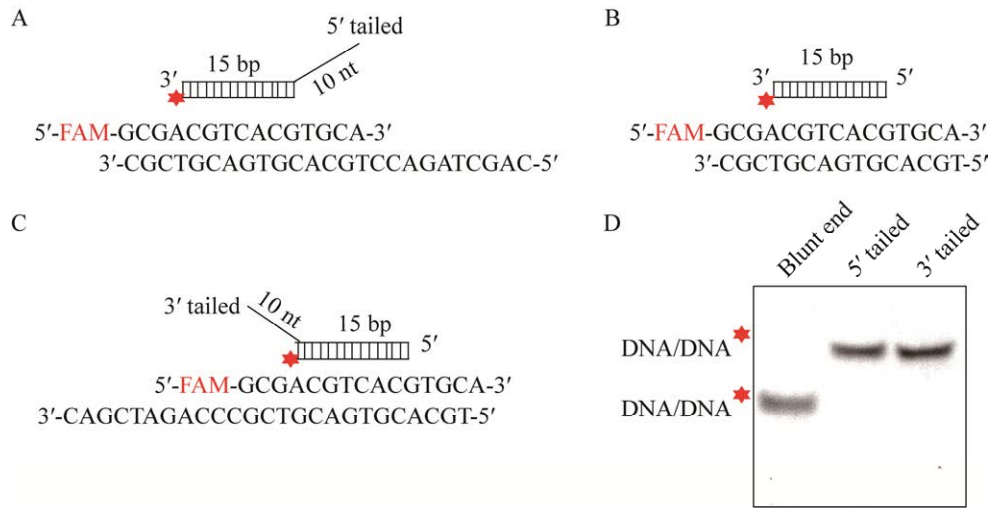


图3 底物结构和退火产物 A: 5'端有尾巴的 dsDNA. B: 平末端的 dsDNA. C: 3'端有尾巴的 dsDNA. D: 退火形成 3 种末端结构的 dsDNA

Figure 3 The structure of three substrates and products of annealing assay. A: dsDNA with a tail at the 5' end. B: dsDNA with a blunt end. C: dsDNA with a tail at the 3' end. D: dsDNA with three terminal structures was formed by annealing reaction.

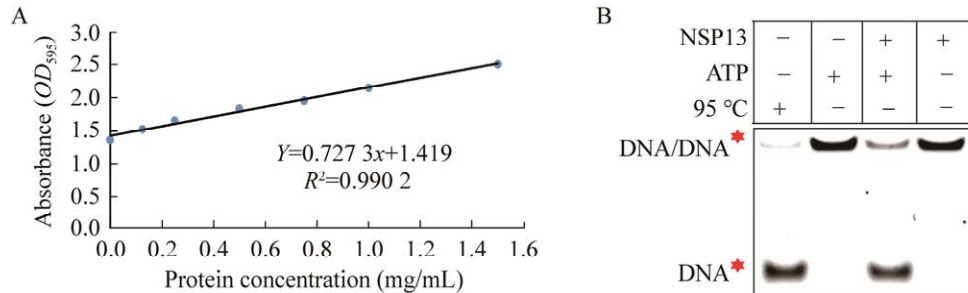


图4 蛋白浓度测定和活性验证 A: 蛋白浓度标准曲线. B: 重组蛋白 NSP13 解旋活性的验证

Figure 4 Detection of protein concentration and verification of the helicase activity of NSP13 protein. A: Protein concentration standard curve. B: Verification of unwinding activity of recombinant protein NSP13.

(酶先加载到单链上)解开双链, 而不是局部解旋的方式(酶直接加载到双链上)。即 PDCoV NSP13 在发挥解旋作用时先加载到底物的 5'单链, 然后按 5'→3'方向逐步解开双链, NSP13 具有 5'→3'解旋极性。

2.7 不同因素对 PDCoV NSP13 解旋活性的影响

酶的活性受到多种因素的影响, 包括酶促反应体系中二价金属离子种类和溶液 pH 等。

在 NSP13 解旋体系中分别加入 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} , 发现存在 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 时, NSP13 具有较好的解旋活性; 存在 Zn^{2+} 时, NSP13 只展现出微弱的解旋活性; NSP13 在含有 Ca^{2+} 体系中则无法发挥解旋活性(图 6A)。当在解旋反应体系中加入不同浓度 Mg^{2+} , 发现低浓度 Mg^{2+} 条件下即可达到最大解旋幅度, 浓度在 0.5–6.0 mmol/L 范围内的 Mg^{2+} 对 NSP13 解旋反应无明显影响(图 6B)。

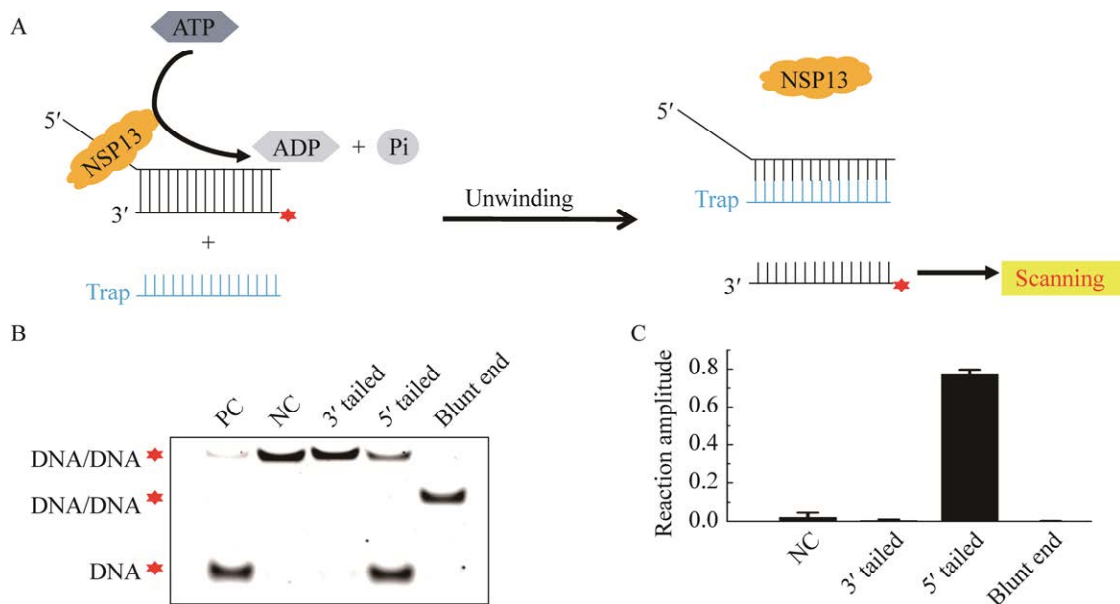


图5 检测重组蛋白 NSP13 的解旋极性 A: NSP13 解旋反应示意图. B: 解旋产物的电泳. C: 不同 dsDNA 的解旋幅度. 图中误差棒表示标准差. PC: 阳性对照; NC: 阴性对照

Figure 5 Detection of unwinding polarity of recombinant protein NSP13. A: Diagram of unwinding assay for NSP13. B: Electrophoresis of the unwinding products. C: Unwinding amplitude of different dsDNA. The error bars in the figure indicate the standard deviation. PC: Positive control; NC: Negative control. The same below.

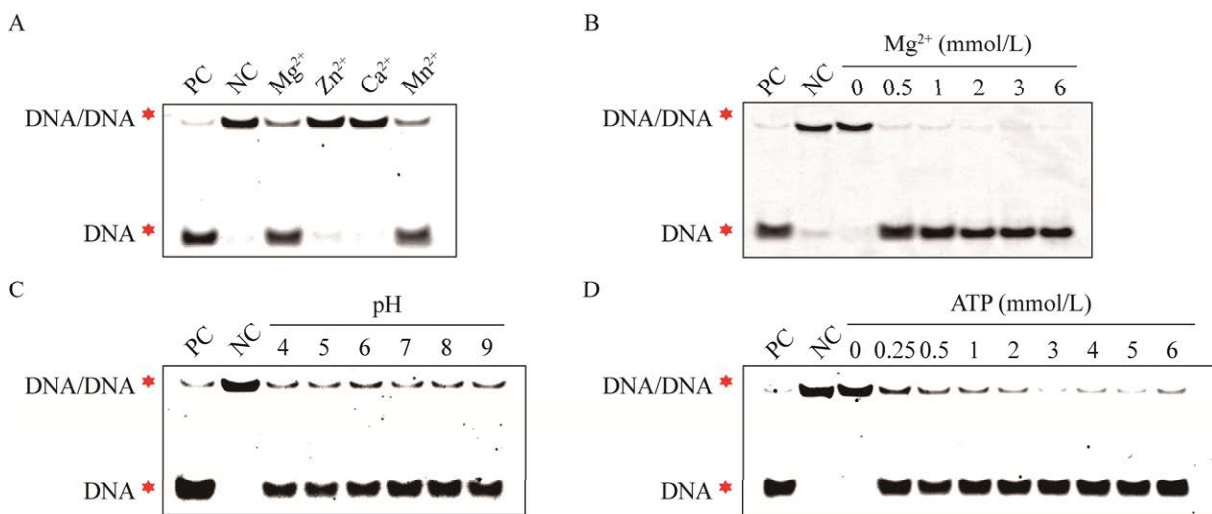


图6 不同因素对 PDCoV NSP13 解旋活性的影响 A: 不同金属离子对 NSP13 催化的解旋反应的影响. B: 不同浓度 Mg^{2+} 对 NSP13 催化的解旋反应的影响. C: 不同 pH 对 NSP13 催化的解旋反应的影响. D: ATP 浓度 NSP13 催化的对解旋反应的影响

Figure 6 Effects of different factors on the unwinding activity of PDCoV NSP13. A: Effect of metal ions to unwinding reactions catalyzed by NSP13. B: Effect of Mg^{2+} concentrations to unwinding reactions catalyzed by NSP13. C: Effect of pH to unwinding reactions catalyzed by NSP13. D: Effect of ATP concentrations to unwinding reactions catalyzed by NSP13.

调节 NSP13 解旋体系的溶液 pH 分别为 4、5、6、7、8 和 9，观测 dsDNA 被解开的幅度，发现 NSP13 在 pH 为 4-9 时，均可以有效地解开 dsDNA，说明一定范围内的溶液 pH 对 NSP13 的解旋反应无明显影响(图 6C)。在解旋反应体系中加入不同浓度 ATP，实验发现 ATP 浓度对 NSP13 解旋反应结果有一定影响，即在低浓度 ATP 范围内，解旋幅度随着 ATP 浓度升高而增大，在 3 mmol/L ATP 时达到最大(图 6D)。

2.8 PDCoV NSP13 具有退火功能

部分解旋酶不仅有解旋活性，还具有退火功能^[17-18]。本研究发现 PDCoV NSP13 是一种移位解旋酶，能够以 ATP 依赖的方式沿着 5'→3' 方向打开底物的核酸双链，但是并不清楚 NSP13 是否也具有退火功能。当在解旋反应体系中加入足量的 TrapDNA (500 nmol/L)，观察不同浓度 NSP13 的解旋反应，发现在低浓度范围内，解旋幅度随着 NSP13 浓度升高而增大，随后达到最大解旋幅度，然而高浓度 NSP13 促使解旋幅度降低(图 7A)，说明 NSP13 浓度过高会抑制解旋活性，但是并不能直接说明 NSP13 具有退火功能。

为了进一步直观地观察 PDCoV NSP13 是否具有退火功能，在反应溶液中加入浓度均为 4 nmol/L 的单链 DNA1-FAM 和 DNA2，发现不加 NSP13 时，少量 ssDNA 能够自发退火形成 dsDNA (图 7B)；当反应体系中加入 160 nmol/L NSP13 时，能够明显观察到 ssDNA 退火形成 dsDNA (图 7C)。说明 PDCoV 的 NSP13 蛋白能够增强 ssDNA 的退火效应，形成更多的 dsDNA，NSP13 退火的具体分子机制有待深入探索。

3 讨论与结论

21 世纪以来，冠状病毒引发了多种类型的传染病，特别是新冠疫情的出现，使得冠状病

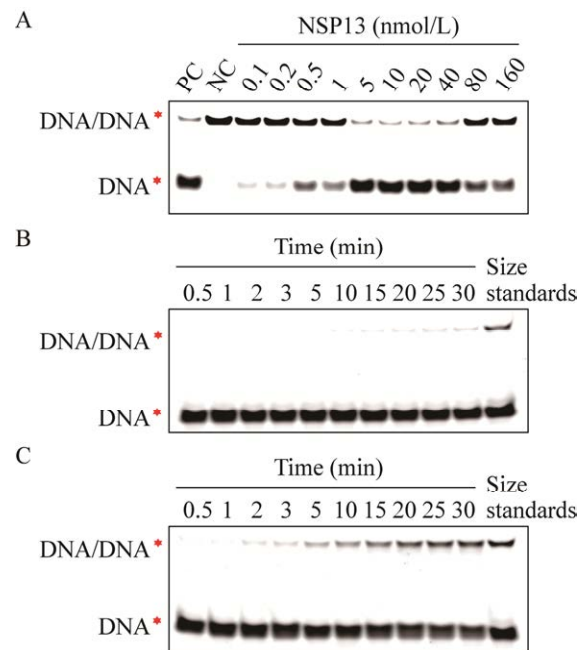


图 7 鉴定 PDCoV NSP13 的退火功能 A: 不同浓度 NSP13 对 dsDNA 解旋反应的影响. B: 不加 NSP13 的 ssDNA 自发退火结果. C: 加入 NSP13 后的 ssDNA 退火结果

Figure 7 Identification of the annealing function of PDCoV NSP13. A: Effects of NSP13 concentrations on the the unwinding reaction of dsDNA. B: Results of spontaneous annealing of ssDNA without NSP13. C: Results of ssDNA annealing after addition of NSP13.

毒更加受到科研人员的重视^[19]。然而，对动物冠状病毒的研究仍然较少。PDCoV 是一种新型的猪肠道致病性冠状病毒，与猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)和猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)等其他猪腹泻性病毒引发的混合感染，是当前养殖场猪腹泻性死亡的主要原因。截至目前，仍然缺少有效的疫苗和抗病毒药物对 PDCoV 进行防治。非结构蛋白 NSP13 是冠状病毒编码的一种解旋酶，不同冠状病毒的 NSP13 在序列上高度保守^[20]。NSP13 是调控病毒复制的关键蛋白，被视为研发广谱抗冠状

病毒药物的理想靶点, 筛选能够靶向 NSP13 从而抑制病毒复制的小分子化合物或天然提取物成为药物研发的重要策略。NSP13 作为冠状病毒编码的解旋酶, 由多个结构域构成, 可以通过构建缺失体等手段来研究这些结构域的具体功能^[21]。通过虚拟筛选、分子对接和分子动力学模拟等方法, 部分能够直接靶向 NSP13 的天然产物和小分子化合物逐渐被发现, 这些药物有望通过调控 NSP13 功能从而达到抑制病毒复制和增殖的效果。

Corona 等^[22]发现杨梅黄酮、槲皮素、山奈酚、黄烷酮和甘草黄酮 C 能够抑制严重急性呼吸道综合征冠状病毒 2 型(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 解旋酶 NSP13 的解旋活性。Adedeji 等^[23]发现小分子化合物 SSYA10-001 也能够抑制 SARS-CoV NSP13 解旋活性。Shu 等^[24]发现枸橼酸铋钾、枸橼酸铋雷尼替丁和枸橼酸铋均能以剂量依赖性的方式抑制 SARS-CoV-2 NSP13 的解旋活性。而且 Yuan 等^[25]发现枸橼酸铋雷尼替丁表现出低细胞毒性, 能够抑制 SARS-CoV-2 的复制, 可使人呼吸道的病毒载量明显减少, 减轻肺炎症状。氯法齐明是一种具有良好安全性的抗麻风病药物, Yuan 等^[26]发现氯法齐明能够抑制冠状病毒 S 蛋白介导的细胞融合以及病毒解旋酶 NSP13 的活性, 具有泛冠状病毒抑制作用, 能够减少肺中的病毒载量和粪便中的病毒排出, 并减轻与病毒感染相关的炎症。但是, 这些已有的研究基本上都局限在体外, 后续需要通过更多的动物实验去证实药物的有效性。中药提取物具有抗氧化、免疫调节、抗病毒、抗菌和抑制酶活性等多种功能^[27-28], 在靶向 NSP13 抑制冠状病毒复制方面展现出潜在的研究价值和广阔的应用前景。

PEDV、SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 这 3 种

冠状病毒的解旋酶 NSP13 具有相似特征, 能够利用 NTP 水解产生的能量, 解开含有 5'-overhang 的 dsDNA^[15,29-30]。而且, 5'-overhang 的长度越长, SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 NSP13 酶促的解旋幅度和反应速率越大^[29,31]。本研究探究了金属离子、溶液 pH、NTP 和酶浓度对 PDCoV NSP13 解旋酶活性的影响, 发现不同金属离子对 PDCoV NSP13 解旋活性的影响存在明显差异, 存在 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 时, NSP13 具有很强的解旋活性, 这与 PEDV 和中东呼吸综合征冠状病毒(middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)解旋酶 NSP13 中的研究结论^[15,32]一致。一定范围内溶液 pH 值(pH 4-9)的变化对 PDCoV NSP13 解旋活性的影响则是不明显, 而 PEDV NSP13 在 pH=5 时观察不到底物的解链, MERS-CoV NSP13 在 pH=4 时底物存在微弱的解链^[15,32]。酶促的解旋反应中可能同时存在两个反应进程, 即双链解旋反应和单链退火反应, 但是由于存在 ATP, 解旋效应远远强于退火, 所以退火效应无法被直接观察。本研究发现 PDCoV NSP13 在 80 nmol/L 时会抑制其自身的解旋活性, 而且 NSP13 还具有促进核酸单链的碱基互补配对形成核酸双链的退火功能, 目前尚无文献对此现象进行报道。本研究有助于理解 NSP13 调控病毒复制的分子机制, 为研发以 NSP13 作为靶点的抗冠状病毒药物奠定了理论基础。

REFERENCES

- [1] WOO PCY, LAU SKP, LAM CSF, LAU CCY, TSANG AKL, LAU JHN, BAI R, TENG JLL, TSANG CCC, WANG M, ZHENG BJ, CHAN KH, YUEN KY. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus

- and deltacoronavirus[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(7): 3995-4008.
- [2] WANG LY, BYRUM B, ZHANG Y. Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(7): 1227-1230.
- [3] AJAYI T, DARA R, MISENER M, PASMA T, MOSER L, POLJAK Z. Herd-level prevalence and incidence of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) and porcine deltacoronavirus (PDCoV) in swine herds in Ontario, Canada[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(5): 1197-1207.
- [4] LEE JH, CHUNG HC, NGUYEN VG, MOON HJ, KIM HK, PARK SJ, LEE CH, LEE GE, PARK BK. Detection and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus in Korean swine farms, 2015[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2016, 63(3): 248-252.
- [5] DUAN C. An updated review of porcine deltacoronavirus in terms of prevalence, pathogenicity, pathogenesis and antiviral strategy[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 8: 811187.
- [6] HE WT, JI X, HE W, DELLICOUR S, WANG SL, LI GR, ZHANG LT, GILBERT M, ZHU HN, XING G, VEIT M, HUANG Z, HAN GZ, HUANG YW, SUCHARD MA, BAELE G, LEMEY P, SU S. Genomic epidemiology, evolution, and transmission dynamics of porcine deltacoronavirus[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2020, 37(9): 2641-2654.
- [7] LI WT, HULSWIT RJG, KENNEY SP, WIDJAJA I, JUNG K, ALHAMO MA, van DIEREN B, van KUPPEVELD FJM, SAIF LJ, BOSCH BJ. Broad receptor engagement of an emerging global coronavirus may potentiate its diverse cross-species transmissibility[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(22): E5135-E5143.
- [8] LIANG QQ, ZHANG HL, LI BX, DING QW, WANG YB, GAO WM, GUO DH, WEI ZY, HU H. Susceptibility of chickens to porcine deltacoronavirus infection[J]. *Viruses*, 2019, 11(6): 573.
- [9] ZHANG HL, DING QW, YUAN J, HAN FF, WEI ZY, HU H. Susceptibility to mice and potential evolutionary characteristics of porcine deltacoronavirus[J]. *Journal of Medical Virology*, 2022, 94(12): 5723-5738.
- [10] LEDNICKY JA, TAGLIAMONTE MS, WHITE SK, ELBADRY MA, ALAM MM, STEPHENSON CJ, BONNY TS, LOEB JC, TELISMA T, CHAVANNES S, OSTROV DA, MAVIAN C, BEAU de ROCHARS VM, SALEMI M, MORRIS JG. Independent infections of porcine deltacoronavirus among Haitian children[J]. *Nature*, 2021, 600: 133-137.
- [11] LEE S, LEE C. Complete genome characterization of Korean porcine deltacoronavirus strain KOR/KNU14-04/2014[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(6): e01191-14.
- [12] 董建国, 饶丹, 覃燕灵, 王艳午, 张宁, 易本驰, 黄立, 刘纪成, 邓凯伟. 猪德尔塔冠状病毒研究进展[J]. *广东农业科学*, 2019, 46(3): 113-118.
- DONG JG, RAO D, TAN YL, WANG YW, ZHANG N, YI BC, HUANG L, LIU JC, DENG KW. Research progress on porcine deltacoronavirus[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2019, 46(3): 113-118 (in Chinese).
- [13] V'KOVSKI P, KRATZEL A, STEINER S, STALDER H, THIEL V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(3): 155-170.
- [14] HORMENO S, WILKINSON OJ, AICART-RAMOS C, KUPPA S, ANTONY E, DILLINGHAM MS, MORENO-HERRERO F. Human HELB is a processive motor protein that catalyzes RPA clearance from single-stranded DNA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(15): e2112376119.
- [15] REN J, DING Z, FANG PX, XIAO SB, FANG LR. ATPase and helicase activities of porcine epidemic diarrhoea virus nsp13[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 257: 109074.
- [16] FRICK DN, VIRDI RS, VUKSANOVIC N, DAHAL N, SILVAGGI NR. Molecular basis for ADP-ribose binding to the Mac1 domain of SARS-CoV-2 nsp3[J]. *Biochemistry*, 2020, 59(28): 2608-2615.
- [17] CHEOK CF, WU L, GARCIA PL, JANCAK P, HICKSON ID. The Bloom's syndrome helicase promotes the annealing of complementary single-stranded DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(12):3932-3941.
- [18] YANG S, WINSTONE L, MONDAL S, WU YL. Helicases in R-loop formation and resolution[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2023, 299(11): 105307.
- [19] WU F, ZHAO S, YU B, CHEN YM, WANG W, SONG ZG, HU Y, TAO ZW, TIAN JH, PEI YY, YUAN ML, ZHANG YL, DAI FH, LIU Y, WANG QM, ZHENG JJ, XU L, HOLMES EC, ZHANG YZ. A new coronavirus

- associated with human respiratory disease in China[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 265-269.
- [20] NEWMAN JA, DOUANGAMATH A, YADZANI S, YOSAATMADJA Y, AIMON A, BRANDÃO-NETO J, DUNNETT L, GORRIE-STONE T, SKYNER R, FEARON D, SCHAPIRA M, von DELFT F, GILEADI O. Structure, mechanism and crystallographic fragment screening of the SARS-CoV-2 NSP13 helicase[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 4848.
- [21] YUE K, YAO B, SHI YC, YANG Y, QIAN ZH, CI YL, SHI L. The stalk domain of SARS-CoV-2 NSP13 is essential for its helicase activity[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2022, 601: 129-136.
- [22] CORONA A, WYCISK K, TALARICO C, MANELFI C, MILIA J, CANNALIRE R, ESPOSITO F, GRIBBON P, ZALIANI A, IACONIS D, BECCARI AR, SUMMA V, NOWOTNY M, TRAMONTANO E. Natural compounds inhibit SARS-CoV-2 nsp13 unwinding and ATPase enzyme activities[J]. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 2022, 5(4): 226-239.
- [23] ADEDEJI AO, SINGH K, KASSIM A, COLEMAN CM, ELLIOTT R, WEISS SR, FRIEMAN MB, SARAFIANOS SG. Evaluation of SSYA10-001 as a replication inhibitor of severe acute respiratory syndrome, mouse hepatitis, and middle east respiratory syndrome coronaviruses[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(8): 4894-4898.
- [24] SHU T, HUANG MH, WU D, REN YJ, ZHANG XY, HAN Y, MU JF, WANG RB, QIU Y, ZHANG DY, ZHOU X. SARS-coronavirus-2 Nsp13 possesses NTPase and RNA helicase activities that can be inhibited by bismuth salts[J]. *Virologica Sinica*, 2020, 35(3): 321-329.
- [25] YUAN SF, WANG RM, CHAN JFW, ZHANG AJ, CHENG TF, CHIK KKH, YE ZW, WANG SY, LEE ACY, JIN LJ, LI HY, JIN DY, YUEN KY, SUN HZ. Metallodrug ranitidine bismuth citrate suppresses SARS-CoV-2 replication and relieves virus-associated pneumonia in Syrian hamsters[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5(11): 1439-1448.
- [26] YUAN SF, YIN X, MENG XZ, CHAN JFW, YE ZW, RIVA L, PACHE L, CHAN CCY, LAI PM, CHAN CCS, POON VKM, LEE ACY, MATSUNAGA N, PU Y, YUEN CK, CAO JL, LIANG RH, TANG KM, SHENG L, DU YS, et al. Clofazimine broadly inhibits coronaviruses including SARS-CoV-2[J]. *Nature*, 2021, 593(7859): 418-423.
- [27] CHEN BR, LI WM, LI TL, CHAN YL, WU CJ. Fucoidan from *Sargassum hemiphyllum* inhibits infection and inflammation of *Helicobacter pylori*[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 429.
- [28] GOU XY, NAWAZ MAH, LIU CY, YANG N, REN J, ZHOU HP, LI YH, ZHU JW, HAN WZ, YU C. Polypeptide induced perylene probe excimer formation and its application in the noncovalent ratiometric detection of matrix metalloproteinase activity[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2022, 10(30): 5774-5783.
- [29] SOMMERS JA, LOFTUS LN, JONES MP 3rd, LEE RA, HAREN CE, DUMM AJ, BROSH RM Jr. Biochemical analysis of SARS-CoV-2 Nsp13 helicase implicated in COVID-19 and factors that regulate its catalytic functions[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2023, 299(3):102980.
- [30] TANNER JA, WATT RM, CHAI YB, LU LY, LIN MC, PEIRIS JS, POON LLM, KUNG HF, HUANG JD. The severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus NTPase/helicase belongs to a distinct class of 5' to 3' viral helicases[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(41): 39578-39582.
- [31] LEE NR, KWON HM, PARK K, OH S, JEONG YJ, KIM DE. Cooperative translocation enhances the unwinding of duplex DNA by SARS coronavirus helicase nsP13[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(21):7626-7636.
- [32] ADEDEJI AO, LAZARUS H. Biochemical characterization of middle east respiratory syndrome coronavirus helicase[J]. *mSphere*, 2016, 1(5): e00235-16.

(本文责编 陈宏宇)