

DOI:10.13350/j.cjpb.220103

• 论著 •

# 新型冠状病毒 RDRP 的原核表达、多克隆抗体制备及生物信息学分析\*

陈柯<sup>1</sup>, 闫硕<sup>2</sup>, 宋桃花<sup>2</sup>, 高岩<sup>2</sup>, 杜昆朋<sup>2</sup>, 郑婉怿<sup>1</sup>, 伊正君<sup>2</sup>, 付玉荣<sup>1\*</sup>

(1. 潍坊医学院基础医学院, 山东潍坊 261053; 2. 潍坊医学院医学检验学院)

**【摘要】** 目的 应用原核表达系统制备重组新型冠状病毒依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RDRP), 纯化后免疫新西兰大白兔获得高效价多克隆抗体, 并对 RDRP 进行生物信息学分析。方法 鉴定正确的 pET-22b RDRP 质粒转化表达载体, 诱导表达 RDRP 蛋白, 纯化后免疫大白兔, 间接 ELISA 法检测其多克隆抗体效价。运用 ExPASy ProtParam、SWISS MODEL 等生物信息学软件对 RDRP 蛋白的等电点、分子量、亲疏水性等理化性质、蛋白的空间结构、跨膜结构域、磷酸化位点、蛋白信号肽进行预测; 构建系统进化树, 进行亲缘性分析。结果 pET-22b RDRP 重组质粒酶切鉴定正确, 经诱导重组蛋白以包涵体的形式表达, 8 mol/L 尿素梯度复性后得到纯度高的 RDRP 蛋白。用纯化蛋白免疫大白兔, 间接 ELISA 检测血清抗体效价 >1:256 000, Western blot 检测抗体具有良好特异性。经生物信息学分析 RDRP 蛋白为亲水性, 非跨膜蛋白, 且无信号肽。11 种病毒系统进化树显示, SARS-CoV-2 RDRP 蛋白与 SARS-CoV RDRP 亲缘关系较近。结论 成功获得重组 SARS-CoV-2 RDRP 蛋白, 用该蛋白免疫大白兔能刺激产生高效价的多克隆抗体。预测与 SARS-CoV RDRP 亲缘关系较近, 为亲水性非跨膜蛋白, 为研究 SARS-CoV-2 RDRP 蛋白的生物学功能及其疫苗的制备奠定了基础。

**【关键词】** 新型冠状病毒; 依赖 RNA 的 RNA 聚合酶; 原核表达; 多克隆抗体

**【中图分类号】** R373.1

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)01-0009-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Jan;17(1):9-13.]

## Preparation of polyclonal antibodies against, prokaryotic expression of, and bioinformatic analysis of a recombinant RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2

CHEN Ke<sup>1</sup>, YAN Shuo<sup>2</sup>, SONG Tao-hua<sup>2</sup>, GAO Yan<sup>2</sup>, DU Kun-peng<sup>2</sup>, ZHENG Wan-yi<sup>1</sup>, YI Zheng-jun<sup>2</sup>, FU Yu-rong<sup>1</sup> (1. School of Basic Medicine, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China; 2. School of Medicine Laboratory, Weifang Medical University) \*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To use a prokaryotic expression system to prepare recombinant SARS-CoV-2 RNA polymerase (RDRP), to obtain high-titer polyclonal antibodies by immunizing New Zealand white rabbits, and to bioinformatically analyze RDRP. **Methods** The pET-22b RDRP was identified as correct and transformed into an expression vector, and then the expression of RDRP was induced. After purification of the RDRP protein, white rabbits were immunized. The titer of polyclonal antibodies was determined using indirect ELISA. Bioinformatic software such as ExPASy ProtParam, and Swiss Model were used to predict the isoelectric point, relative molecular, hydrophilicity and hydrophobicity, spatial structure, transmembrane domains, phosphorylation sites, and protein signal peptides of RDRP and to construct an evolutionary tree for genetic analysis. **Results** Recombinant pET-22b RDRP was identified as correct according to enzyme digestion. Expression of the recombinant protein was induced in the form of inclusion bodies. After protein refolding using an 8 mol/L urea gradient, the target protein was obtained with a high level of purity. After rabbits were immunized with the purified protein, the titer of polyclonal antibodies was more than 1:256 000 according to indirect ELISA. Western blotting indicated that the antibodies had good specificity. According to bioinformatic analysis, the RDRP protein was a hydrophilic non-transmembrane protein with no signal peptides. A phylogenetic tree of 11 viruses indicated that SARS-CoV-2 and SARS-CoV RDRP had a high level of affinity. **Conclusion** Recombinant RDRP was successfully prepared, and it yields high-titer antibodies. Results predicted that it is closely related to SARS-CoV RDRP, which is a hydrophilic non-transmembrane protein. These findings have laid the foundation for studying the biological function of the SARS-CoV-2 RDRP protein and the preparation of vaccines.

\* **【基金项目】** 山东省自然科学基金重大基础研究项目(No. ZR2018ZC1054)。

\*\* **【通讯作者】** 付玉荣, E-mail: yifuyurong@163.com

**【作者简介】** 陈柯(1995-), 女, 四川成都人, 在读研究生。研究方向: 感染与免疫。E-mail: kchen1995@163.com

【Key words】 SARS-CoV-2; RDRP; prokaryotic expression; polyclonal antibody

新冠肺炎(COVID-19)是由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)引起的急性呼吸道传染病,主要表现为发热、咳嗽、肌肉酸痛、胸痛、腹泻等症状,并伴有器官功能障碍<sup>[1]</sup>。COVID-19在全球范围内的蔓延对人类健康和公共卫生安全构成了严重威胁<sup>[2]</sup>,WHO已经宣布将COVID-19列为国际突发公共卫生事件,然而目前尚无针对COVID-19的特效药,因此疫苗的研制与应用备受关注。

SARS-CoV-2是一类有包膜的单正链RNA病毒,具有高度传染性和强致病性,主要通过呼吸道途径介导促炎细胞因子和细胞毒作用,引起急性呼吸窘迫综合征<sup>[3]</sup>。RDRP是由ORF1ab基因编码的多聚蛋白裂解产生的非结构蛋白,在SARS-CoV-2复制和转录过程中起核心作用<sup>[4]</sup>。本实验应用原核表达系统诱导表达SARS-CoV-2 RDRP,纯化后免疫大白兔制备多克隆抗体,并通过生物信息学软件对RDRP蛋白进行结构及功能预测和分析,为SARS-CoV-2的临床诊断及疫苗制备奠定基础。

## 材料与方 法

### 1 材 料

**1.1 菌株** 大肠埃希菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞和BL21(DE3)感受态细胞为本实验室保存;pET-22b RDRP重组质粒购自上海海吉浩格生物科技有限公司;

**1.2 试剂** Nde I和Xho I限制性内切酶,Taq酶及质粒小提试剂盒购自日本TaKaRa公司;蛋白质分子量标准购自美国Thermo公司;异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷,聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂及TMB显色液购自北京Solarbio公司;小鼠抗His Tag抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠IgG购自武汉ABchonal公司;Super DNA Marker购自康为世纪生物有限公司;

**1.3 试验动物** 成年雌性新西兰大白兔购自潍坊医学院实验动物中心。

### 2 方 法

**2.1 pET-22b RDRP重组质粒的鉴定** 将pET-22b RDRP重组质粒转化入DH5 $\alpha$ 感受态,在含氨苄青霉素抗性的LB平板上进行初筛,挑取平板上生长较慢的单个菌落,增菌培养12 h后,用质粒小提试剂提取质粒,采用Nde I和Xho I对重组质粒双酶切,进行1%琼脂糖凝胶电泳分析。

**2.2 pET-22b RDRP原核重组质粒转化及目的蛋白的诱导表达** 将酶切鉴定正确的重组质粒转化入BL21感受态获得表达菌株,在平板上挑取单克隆菌落

接种于5 ml的含氨苄青霉素抗性(Amp<sup>+</sup>)的LB液体培养基中,37  $^{\circ}$ C、180 r/min振荡过夜活化。次日将过夜培养的菌液以1:100的比例接种到200 ml Amp<sup>+</sup>(1:1000)LB培养基中,37  $^{\circ}$ C、150 r/min继续培养至吸光度A<sub>600</sub>为0.4~0.6,加入浓度为0.5 mmol/L的IPTG,37  $^{\circ}$ C诱导表达6 h,4  $^{\circ}$ C、8 000 r/min(离心半径10 cm)离心15 min,收集菌体沉淀。将收集的菌体重悬于预冷Tris中,每克细菌细胞加入约3 ml Tris。在冰浴状态下,超声破碎裂解菌体(350 W,超声3 s,暂停5 s,99个循环),4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min(离心半径10 cm)离心30 min,分别收集上清和沉淀进行10%SDS-PAGE分析。

**2.3 RDRP蛋白的纯化、复性及鉴定** 用50 ml包涵体洗涤液I(0.5%(v/v) TritoX-100(曲拉通),10 mmol/L EDTA)重悬菌体沉淀,4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min(离心半径10 cm)离心15 min,保留沉淀。然后用含10%(v/v) TritoX-100(曲拉通)和10 mmol/L EDTA的包涵体洗液II再次重悬沉淀至均质悬浊状,4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min(离心半径10 cm)离心15 min,分别收集上清(包涵体洗涤液)和沉淀。在洗涤后的沉淀中加入适量含8 mol/L尿素溶液(0.1 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O,0.01 mol/L Tris·Base,8 mol/L尿素)充分振荡,4  $^{\circ}$ C静置3 h后和8 mol/L尿素溶解后上清分别进行SDS-PAGE分析。将8 mol/L尿素溶解后上清装入透析袋,于4  $^{\circ}$ C条件下依次使用6、4、3、2、1 mol/L尿素透析复性液梯度透析复性12 h,用PBS透析2次,每次6 h。透析后的复性液4  $^{\circ}$ C、8 000 r/min(离心半径10 cm)离心5 min,取上清进行10%SDS-PAGE和Western blot分析。

**2.4 多克隆抗体的制备** 以重组RDRP蛋白为免疫原,选取雌性新西兰大白兔2只进行免疫,首次免疫将重组蛋白与弗氏完全佐剂以1:1比例混合,乳化后对大白兔背部皮下进行多点注射,免疫量为1 mg/只。每隔1周进行加强免疫1次,加强免疫用不完全弗氏佐剂与重组蛋白等比例混合乳化,每次500  $\mu$ g/只。4次加强免疫1周后心脏采血,采用间接ELISA法测定血清抗体效价。

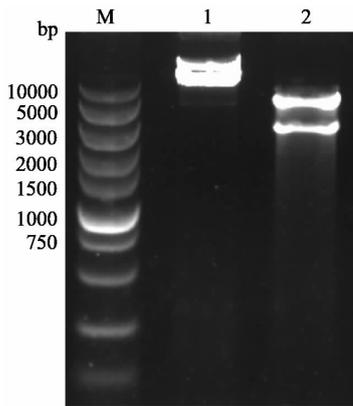
**2.5 RDRP蛋白生物信息学分析** 利用Expasy PortParam等软件分析RDRP蛋白的等电点、分子量以及亲疏水性等理化性质;利用SWISS MODEL软件分析蛋白序列,预测分析RDRP蛋白的空间结构;利用Sopma在线软件分析蛋白的二级结构;利用TMHMMN软件在线分析蛋白的跨膜结构域;利用NetPhos 3.1 Server软件在线分析蛋白的磷酸化位

点;利用 ProtScale 软件分析蛋白亲疏水性;利用 SignalP 4.1 Server 在线分析蛋白的信号肽;NCBI 检索急性呼吸综合征冠状病毒、中东呼吸综合症冠状病毒、呼吸道合胞病毒等 11 种病毒的 RDRP 蛋白序列,运用 MEGA-X 构建蛋白系统进化树,进行系统进化分析。

## 结果

### 1 重组质粒的酶切鉴定

将抽提的重组质粒 Nde I 和 Xho I 双酶切后进行 SDS-PAGE 电泳,得到 2 832 bp 和 5 373 bp 片段,其大小与设计预期片段相符(图 1),表明重组原核表达质粒鉴定正确。



M DNA 标志物 1 pET22b-RDRP 质粒 2 pET22b-RDRP 双酶切

图 1 pET22b-RDRP 质粒的双酶切鉴定

M DNA marker 1 pET22b-RDRP plasmid 2 pET22b-RDRP double digestion

Fig. 1 Identification of double enzyme digestion of pET22b-RDRP

### 2 重组 RDRP 蛋白的表达及表达条件优化

表达菌体经超声破碎裂解后分别收集上清和沉淀,进行 SDS-PAGE 电泳鉴定蛋白的表达方式,结果如图 2A。电泳出现一条 108.2 ku 表达条带,与预期融合蛋白分子质量一致。用优化的条件进行诱导,重组蛋白以包涵体的形式表达,其中 IPTG 浓度为 1 mmol/L、37 °C 诱导 4 h 蛋白的表达量最高(图 2B)。

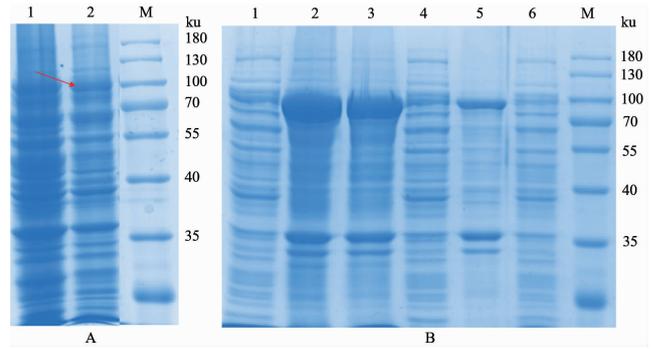
### 3 重组 RDRP 蛋白的纯化及复性

采用包涵体洗液 I、II 对重组 RDRP 蛋白进行洗涤,8 mol/L 尿素使包涵体变性,电泳结果显示,包涵体洗液不能将蛋白洗出,重组蛋白主要在 8 mol/L 尿素中溶解(图 3)。重组蛋白梯度透析复性后 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 分析,结果显示得到目的蛋白纯度较高但含量相对较少(图 3)。

### 4 多克隆抗体的特异性分析及效价检测

4 次加强免疫后兔血清与原核表达的 RDRP 蛋白进行 Western blot 检测,如图 4 显示。在重组 RDRP 蛋白相应分子质量位置有反应条带,表明多抗具有良

好的特异性。间接 ELISA 检测兔血清抗重组 RDRP 蛋白多克隆抗体效价 >1 : 256 000(图 5)。

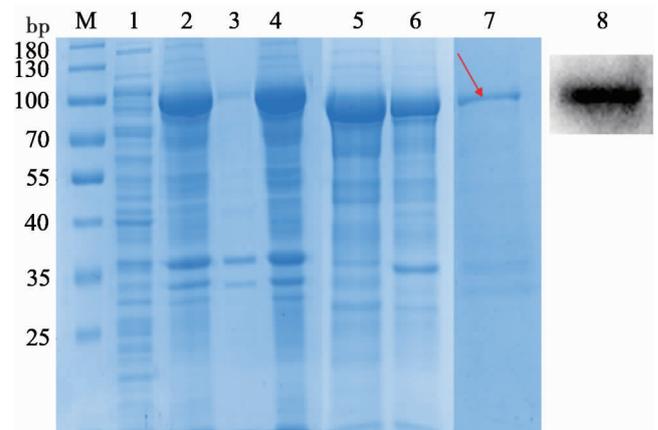


M 蛋白分子质量标准 A1 重组菌未诱导 A2 重组菌 IPTG 37 °C 诱导 2 h B1 重组菌 IPTG 37 °C 诱导 4 h 超声破碎上清 B2 重组菌 IPTG 37 °C 诱导 4 h 超声破碎沉淀 B3 重组菌 IPTG 37 °C 诱导 2 h 超声破碎沉淀 B4 重组菌 IPTG 37 °C 诱导 2 h 超声破碎上清 B5 重组菌 IPTG 25 °C 诱导 6 h 超声破碎沉淀 B6 重组菌 IPTG 25 °C 诱导 6 h 超声破碎上清

图 2 RDRP 蛋白的诱导表达

M Protein molecular quality standard A1 Not inducing Recombinant bacteria A2 Recombinant bacteria was induced by IPTG for 2 h at 37 °C B1 The supernatant of ultrasonic fragmentation induced by recombinant bacteria at IPTG 37 °C for 4 h B2 Precipitation of ultrasonic fragmentation induced by recombinant bacteria at IPTG 37 °C for 4 h B3 Ultrasonic fragmentation and precipitation induced by recombinant bacteria at IPTG 37 °C for 2 h B4 The supernatant of ultrasonic fragmentation induced by recombinant bacteria at IPTG 37 °C for 2 h B5 Ultrasonic fragmentation and precipitation induced by recombinant bacteria at IPTG 25 °C for 6 h B6 The supernatant of ultrasonic fragmentation induced by recombinant bacteria at IPTG 25 °C for 6 h

Fig. 2 Induced expression of RDRP

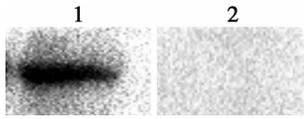


M 蛋白分子质量标准 1 洗涤前上清 2 洗涤前沉淀 3 洗涤后上清 4 洗涤后沉淀 5 8 mol/L 尿素变性后上清 6 8 mol/L 尿素变性后沉淀 7 透析复性液 8 纯化蛋白的 Western bolt 检测

图 3 重组蛋白 RDRP 纯化及鉴定

M Protein molecular weight standard 1 Supernatant before washing 2 Precipitation before washing 3 Supernatant after washing 4 Precipitation after washing 5 Supernatant of denatured 8 mol/L urea 6 Precipitation after denaturation of 8 mol/L urea 7 Renatured dialysate 8 Detection of purified protein by Western bolt

Fig. 3 Purification and identification of recombinant RDRP



1 免疫兔血清与 RDRP 反应条带 2 免疫前兔血清对照  
图 4 多克隆抗体的 Western bolt 检测

1 Immunized rabbit serum and RDRP reaction band 2 Control of rabbit serum before immunization

Fig. 4 Western blot detection of polyclonal antibodies

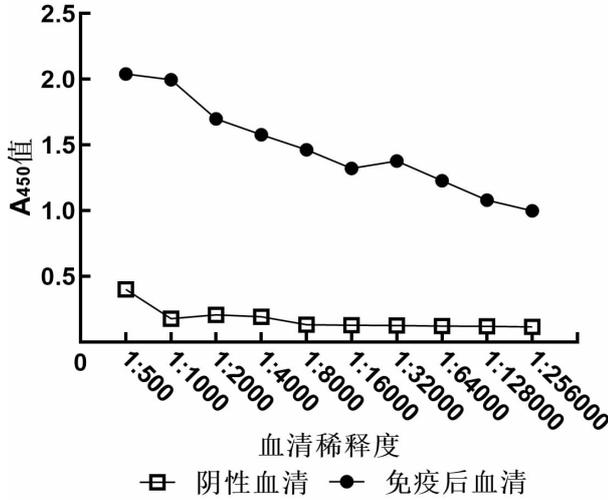


图 5 间接 ELISA 检测 RDRP 免疫兔血清抗体效价

Fig. 5 Indirect ELISA results of anti-RDRP polyclonal antibodies

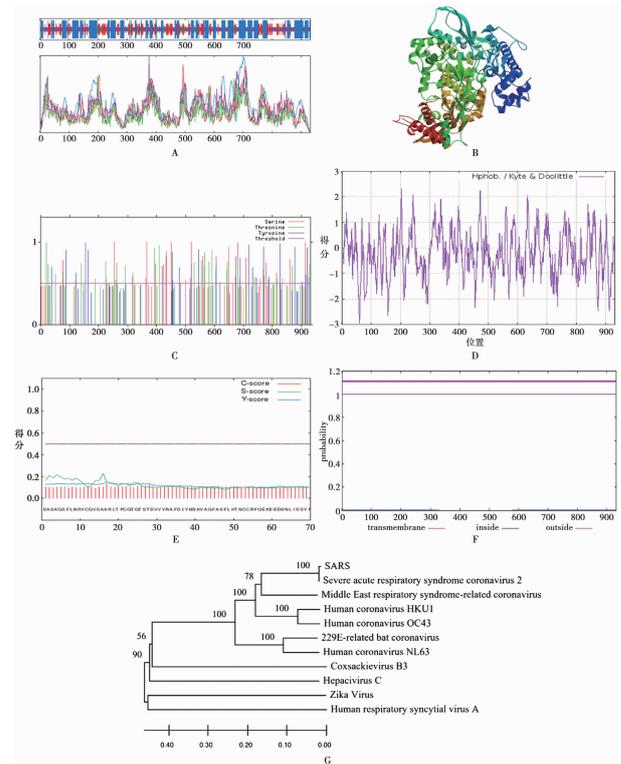
### 5 RDRP 蛋白生物信息学分析

SWISS MODEL 分析 RDRP 蛋白由 932 个氨基酸组成;Expassy PortParam 预测蛋白的相对分子质量为  $106.66024 \times 10^6$ , 分子式为  $C_{4792}H_{7265}N_{1259}O_{1401}S_{54}$ , 理论等电点为 6.14, 消光系数(280 nm)为 137 670, 脂肪指数为 78.43, 蛋白的不稳定指数为 28.32, 为稳定蛋白;RDRP 蛋白亲水性的平均值为 -0.224, 推测为亲水性蛋白。蛋白的二级结构包含 42.06% 的  $\alpha$  螺旋、19.10% 延长线、7.62%  $\beta$  转角和 31.22% 的无规卷曲; NetPhos 3.1 Server 软件预测 SARS-CoV-2 RDRP 蛋白共含有 79 个磷酸化位点, 分别是 22 个丝氨酸(Serine)、32 个苏氨酸(Threonine)和 25 个酪氨酸(Tyrosine)磷酸化优势位点; RDRP 蛋白为非跨膜蛋白且无信号肽。系统进化树显示, SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 位于同一分支, 亲缘关系较近(图 6)。

### 讨论

SARS-CoV-2 广泛传染性的关键在于引起免疫逃逸突变株的大流行, 因此深入开展对病毒转录和复制的分子机制的研究尤为重要。SARS-CoV-2 包含 4 种主要结构蛋白, 即刺突、膜、包膜和核衣壳蛋白, 还编码 16 种非结构蛋白和 9 种辅助蛋白<sup>[5]</sup>。其中非结构蛋白 RDRP 是病毒生命周期中所必须的复制和转录关

键酶之一。在 SARS-CoV-2 入侵宿主后, 由自身编码基因组编码蛋白 RDRP 作为催化核心, 活性位点与 RNA 结合, 其残基 N691、S682 和 D623 可特异性识别核苷三磷酸(NTP)的 2'-OH 基团, 与辅助因子 nsp7 和 nsp8 形成复合体参与病毒的复制与转录<sup>[6-7]</sup>。非结构蛋白 nsp14 的 N 端核酸外切酶与其辅因子 nsp10 在病毒复制过程中参与 RNA 校对。SARS-CoV-2 RDRP 与 SARS-CoV 的聚合酶基因组序列一致性达到 96%, 其催化位点序列和结构也具有高度保守性<sup>[8-9]</sup>。抑制 RDRP 活性是抗 SARS-CoV-2 感染的潜在分子靶标<sup>[10]</sup>。RDRP 也是抗病毒抑制剂筛选的重要靶点, 通过构建三维结构, 以 RDRP 为靶点进行分子筛选, 发现广谱抗病毒药物 remdesivir 等可与酶催化位点结合从而抑制其酶活性<sup>[11]</sup>。



A 蛋白二级结构预测 B 三级结构预测 C 磷酸化位点预测  
D 亲疏水性分析(亲/疏水性分别用负/正分值表示) E 信号肽预测  
F 跨膜结构预测 G 11 种病毒 RDRP 蛋白的进化树

图 6 RDRP 蛋白生物信息学分析

A Prediction of protein secondary structure B Tertiary structure prediction C Phosphorylation site prediction D Hydrophobicity analysis (hydrophilicity / hydrophobicity is expressed by negative / positive scores respectively) E Signal peptide prediction F Prediction of transmembrane structure G Evolutionary tree of RDRP proteins of 11 viruses

Fig. 6 Bioinformatics analysis of RDRP

SARS-CoV-2 RDRP 是由 932 个氨基酸组成的聚合酶, 其功能结构域由手指、手掌和拇指域 3 个亚结构域组成, 其中活性位点由手掌结构域和手指子域中 7 个保守的聚合酶基序 A 到 G 组成<sup>[4]</sup>。RDRP 除了在

病毒基因组转录和复制中的核心作用外,其还包含一个功能未知的 NiRAN 结构域。应用生物信息学在线软件预测分析,RDRP 为亲水性非跨膜蛋白,无信号肽。该蛋白与 SARS-CoV RDRP 蛋白的亲缘性较高,与呼吸道合胞病毒、柯萨奇病毒 B 组同源较低,推测其可作为呼吸道病毒鉴别诊断分子标志物。目前对 SARS-CoV-2 蛋白的研究主要集中在对其分子结构以及结构蛋白的克隆表达、抗体制备等方面<sup>[12-15]</sup>。对于 RDRP 主要是通过建立病毒 RDRP 模型进行酶结构与活性研究,以及测试与候选靶向药物的结合亲和力等<sup>[16-17]</sup>。相关研究阐明全长 RDRP 难以在细菌系统中表达,这既阻碍了冠状病毒 RNA 合成机制研究,也阻碍了针对 RDRP 的抗病毒药物设计<sup>[18]</sup>。

本研究利用 pET-22b RDRP 原核表达载体诱导表达 RDRP 后,可能由于重组蛋白分子质量较大,原核表达系统缺乏蛋白修饰系统,SDS-PAGE 检测结果显示,重组蛋白以包涵体的形式表达。在尿素梯度复性过程中,重组蛋白易沉淀,需将尿素梯度放缓且复性液中加入 10% 甘油和 4 mmol/L DTT 有助于蛋白的正确折叠,复性后用抗 His 单克隆抗体对蛋白进行 Western blot 鉴定,显示重组蛋白具有良好的特异性。以重组蛋白 RDRP 作为抗原对大白兔进行多次皮下免疫,得到高效价的多克隆抗体血清,为研究 RDRP 生物学功能及蛋白调控机制奠定了基础,研究结果可为疫苗研制和以 RDRP 为靶点抗病毒药物研发提供参考。

#### 【参考文献】

- [1] Chen N,Zhou M,Dong X,et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study [J]. Lancet, 2020, 395 (10223):507-513.
- [2] Jean SS,Lee PI,Hsueh PR. Treatment options for COVID-19: The reality and challenges[J]. J Microbiol Immunol Infect,2020, 53 (3):436-443.
- [3] Liu J,Zheng X,Tong Q,et al. Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV [J]. J Med Virol,2020,92 (5):491-494.
- [4] Gao Y,Yan L,Huang Y,et al. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus [J]. Science, 2020, 368 (6492):779-782.
- [5] Dai L,Gao GF. Viral targets for vaccines against COVID-19 [J]. Nat Rev Immunol,2021,21 (2):73-82.
- [6] Hillen HS,Kokic G,Farnung L,et al. Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase [J]. Nature,2020,584(7819):154-156.
- [7] Ma Y,Wu L,Shaw N,et al. Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14-nsp10 complex [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2015,112(30):9436-9441.
- [8] Elfiky AA. Anti-HCV, nucleotide inhibitors, repurposing against COVID-19 [J]. Life Sci,2020,248:117477.
- [9] Shannon A,Le NT,Selisko B,et al. Remdesivir and SARS-CoV-2:Structural requirements at both nsp12 RdRp and nsp14 Exonuclease active-sites [J]. Antiviral Res,2020,178:104793.
- [10] Machitani M,Yasukawa M,Nakashima J,et al. RNA-dependent RNA polymerase,RdRP,a promising therapeutic target for cancer and potentially COVID-19 [J]. Cancer Sci, 2020, 111 (11): 3976-3984.
- [11] Wang Q,Wu J,Wang H,et al. Structural basis for RNA replication by the SARS-CoV-2 polymerase [J]. Cell, 2020, 182 (2): 417-428.
- [12] Ke Z,Oton J,Qu K,et al. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions [J]. Nature, 2020, 588 (7838):498-502.
- [13] Shin D,Mukherjee R,Grewe D,et al. Papain-like protease regulates SARS-CoV-2 viral spread and innate immunity [J]. Nature,2020,587 (7835):657-662.
- [14] Perdikari TM,Murthy AC,Ryan VH,et al. SARS-CoV-2 nucleocapsid protein phase-separates with RNA and with human hnRNPs [J]. EMBO J,2020,39 (24):e106478.
- [15] Barnes CO,Jette CA,Abernathy ME,et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies [J]. Nature,2020,588 (7839):682-687.
- [16] Fu L,Ye F,Feng Y,et al. Both Boceprevir and GC376 efficaciously inhibit SARS-CoV-2 by targeting its main protease [J]. Nat Commun,2020,11 (1):4417.
- [17] Buonaguro L,Tagliamonte M,Tornesello ML,et al. SARS-CoV-2 RNA polymerase as target for antiviral therapy [J]. J Transl Med,2020,18 (1):185.
- [18] te Velthuis AJW,Arnold JJ,Cameron CE,et al. The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent [J]. Nucleic Acids Res,2010,38 (1):203-214.

【收稿日期】 2021-07-20 【修回日期】 2021-12-15