



猫传染性腹膜炎病毒 RdRp 复合物的表达纯化及酶活性验证

杨 微¹, 卢 昀¹, 张 然¹, 张婉婷¹, 任瑞文^{2,3}, 蒋红霞¹, 汤有志^{1*}

(1. 华南农业大学兽医学院 广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广州 510642;

2. 南部战区疾病预防控制中心, 广州 510507; 3. 广东省虫媒病毒性传染病应急技术研究中心, 广州 510507)

摘 要: 猫传染性腹膜炎病毒(feline infectious peritonitis virus, FIPV)的非结构蛋白(non structure protein, NSP)12是RNA依赖性RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)核心组分,但其与辅助因子NSP7、NSP8之间的相互作用以及RdRp复合体的功能尚不清楚。本研究旨在分析NSP12的分子特征,探究其与NSP7、NSP8的相互作用,并验证RdRp复合体的酶活性。首先,采用生物信息学方法预测NSP12的理化性质及结构特征。为探究FIPV RdRp复合物中NSP7、NSP8和NSP12之间的相互作用,构建了pcDNA3.1-Flag-NSP7, pcDNA3.1-HA-NSP8和pcDNA3.1-Myc-NSP12质粒,转染至293T细胞后,利用免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP)、蛋白质体外结合(Pull-down)和间接免疫荧光试验(indirect immunofluorescence assay, IFA)检测蛋白互作及共定位。其次,利用PCR扩增FIPV的NSP7、NSP8和NSP12基因,并将其分别同源重组至pET-30α载体,构建原核表达重组质粒。进一步优化诱导表达条件,采用镍柱亲和层析纯化蛋白,并通过超滤管浓缩获得RdRp复合物。最后,建立FIPV RdRp体外RNA延伸体系,并基于凝胶方法检测RdRp复合物的酶活性。生物信息学分析表明,NSP12为稳定的亲水性蛋白,包含43.51%的α螺旋、45.02%的无规则卷曲以及90个潜在磷酸化位点。Co-IP、Pull-down和IFA试验证实,在293T细胞中NSP7、NSP8与NSP12之间存在相互作用并发生共定位。原核表达结果显示,NSP7和NSP8蛋白以包涵体形式表达,相对分子质量为10和23 ku, NSP12则以可溶性蛋白形式表达,相对分子质量为105 ku。酶活性试验结果表明,RdRp复合物能够延伸RNA模板链,而单独的NSP12则无此活性。本研究通过原核表达纯化了FIPV RdRp复合物,并建立了体外酶活性检测体系。首次证实FIPV-DF2毒株的NSP12需与NSP7、NSP8形成复合体才能发挥RdRp功能,为进一步探究FIPV RdRp的生物学功能及开发靶向RdRp的抗病毒药物奠定基础。

关键词: 猫传染性腹膜炎病毒;RNA依赖性RNA聚合酶;NSP7;NSP8;NSP12;酶活性

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)02-0965-14

Expression, Purification and Enzymatic Activity Verification of Feline Infectious Peritonitis Virus RdRp Complex

YANG Wei¹, LU Yun¹, ZHANG Ran¹, ZHANG Wanting¹, REN Ruiwen^{2,3},
JIANG Hongxia¹, TANG Youzhi^{1*}

- (1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Veterinary Pharmaceuticals Development and Safety Evaluation, College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2. Center for Disease Control and Prevention of Southern Theater Command, Guangzhou 510507, China;
3. Guangdong Arbovirus Diseases Emergency Technology Research Center, Guangzhou 510507, China)

收稿日期: 2025-05-29

基金项目: 国家自然科学基金(32473093)

作者简介: 杨 微, 主要从事基础兽医药理学研究, E-mail: 15776581772@163.com

* 通信作者: 汤有志, 主要从事基础兽医药理学研究, E-mail: youzhitang@scau.edu.cn

Abstract: The non-structure protein (NSP) 12 of feline infectious peritonitis virus (FIPV) serves as the catalytic core component of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). However, the molecular mechanisms regulating its interactions with NSP7 and NSP8, as well as the enzymatic activity and function of the RdRp complex, remain to be fully elucidated. This study aims to investigate the molecular characteristics of NSP12, explore its interaction with NSP7 and NSP8, and verify the enzymatic activity of the RdRp complex. Firstly, the physicochemical properties and structural features of NSP12 were predicted by bioinformatics analysis. To investigate the interaction between NSP7, NSP8 and NSP12 in the FIPV RdRp complex, pcDNA3.1-Flag-NSP7, pcDNA3.1-HA-NSP8 and pcDNA3.1-Myc-NSP12 plasmids were constructed and expressed in 293T cells. The protein interactions and co-localization were detected using co-immunoprecipitation (Co-IP), pull-down, and indirect immunofluorescence assay (IFA). Secondly, the *NSP7*, *NSP8* and *NSP12* genes of FIPV were amplified by PCR and homologously recombined into the pET-30 α vector to construct prokaryotic expression recombinant plasmids. The induced expression conditions were further optimized, and the proteins were purified by nickel column affinity chromatography and concentrated using an ultrafiltration tube to obtain the RdRp complex. Finally, an *in vitro* RNA elongation system for FIPV RdRp was established, and the enzymatic activity of the RdRp complexes obtained above was tested using the gel method. Bioinformatics analysis showed that NSP12 was a stable hydrophilic protein, containing 43.51% α helices, 45.02% random coils and 90 potential phosphorylation sites. The Co-IP, pull-down, and IFA assays confirmed the interaction and co-localization of NSP7, NSP8 and NSP12 in 293T cells. NSP7 and NSP8 were expressed as inclusion bodies, with molecular masses of 10 and 23 ku, respectively. In contrast, NSP12 was expressed as a soluble protein, with a molecular mass of 105 ku. The results of the enzyme activity assay demonstrated that the RdRp complex exhibited the capacity to extend the RNA template strand. Conversely, NSP12 alone exhibited no such activity. In this study, the FIPV RdRp complex was purified by prokaryotic expression and an enzyme activity detection system was established *in vitro*. It was confirmed for the first time that NSP12 from the FIPV-DF2 strain requires the formation of a complex with NSP7 and NSP8 to exert its RdRp function. This study lays the foundation for further exploring the biological function of FIPV RdRp and developing antiviral drugs targeting RdRp.

Keywords: feline infectious peritonitis virus; RNA-dependent RNA polymerase; NSP7; NSP8; NSP12; enzyme activity

* **Corresponding author:** TANG Youzhi, E-mail: youzhitang@scau.edu.cn

猫传染性腹膜炎病毒(feline infectious peritonitis virus, FIPV)是猫冠状病毒(feline coronavirus, FCoV)的致病性变异株,可引发猫传染性腹膜炎(feline infectious peritonitis, FIP)。该病是一种可导致野猫和家猫死亡的全身性、免疫介导疾病,一旦出现典型的临床症状,病死率接近100%^[1]。近年来,随着宠物猫数量的增加,FIP的全球流行率持续上升,对猫科动物健康构成严重威胁。然而,目前尚无针对FIP的特异性抗病毒药物或高效疫苗,临床治疗仍以支持疗法为主,效果有限^[2]。因此,深入

研究FIPV复制机制,并从中挖掘关键药物作用靶点,是推动FIP防控、保障猫科动物健康领域亟待解决的关键科学问题。冠状病毒的基因组复制和转录依赖于病毒编码的非结构蛋白(non structure protein, NSP)所组成的复制-转录复合体(replication transcription complex, RTC)^[3]。其中,RNA依赖性RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp, 即NSP12)是催化病毒RNA合成的核心酶^[4],具有结构保守、催化活性中心不易突变等特点,被认为是抗病毒药物设计的理想靶点^[5]。研究

证明,在其它冠状病毒(如 SARS-CoV-2、SARS-CoV)中,NSP12 需与辅助因子 NSP7、NSP8 结合形成复合体,以稳定其构象并激活 RdRp 功能^[6-7]。然而,在 FIPV-DF2 毒株中,NSP12 与 NSP7、NSP8 之间的相互作用模式及 RdRp 复合体的功能特性尚未明确。尽管已有研究报道 FIPV-NSP12 的基因序列特征^[8],但其蛋白质的分子特性(如结构稳定性、翻译后修饰位点)及其与辅助因子的协同机制仍缺乏系统性解析。此外,针对 FIPV-RdRp 的体外功能研究受限于具有活性的复合体蛋白制备技术,阻碍了针对该靶点的药物筛选与机制研究。因此,阐明 NSP12 的分子特征、验证其与 NSP7/NSP8 的互作关系,并建立具有酶活性的 RdRp 复合体外重构方法,对揭示 FIPV 复制机制及开发新型抗病毒策略具有重要意义。

本研究以 FIPV-DF2 毒株为对象,首先通过生物信息学分析揭示 NSP12 为亲水性稳定蛋白及其结构特征。随后,利用真核表达系统验证 NSP7/8/12 在 293T 细胞中的互作与共定位关系。为获得功能性 RdRp 复合体,本研究优化了原核表达体系,分别采用包涵体纯化(NSP7/8)和可溶性表达(NSP12)策略获得纯化蛋白,并成功组装出 RdRp 复合体。最终,通过体外酶活试验证实 NSP12 需依赖 NSP7/8 辅助才能发挥 RNA 聚合酶功能。本研究不仅首次阐明 FIPV RdRp 复合体的功能机制,还建立了该复合体的原核表达与纯化体系,为基于 RdRp 靶点的抗病毒药物研发和酶动力学研究提供了关键技术基础,具有重要的理论价值与应用前景。

1 材料与方法

1.1 病毒、菌株和载体

FIPV-DF2(GenBank accession number AFH55129.1)毒株购自 ATCC; *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞购自上海生物工程有限公司; pcDNA3.1 和 pET-30 α 载体购自上海君跃生物有限公司。

1.2 主要试剂

PCR 产物纯化试剂盒、质粒小提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自广州飞扬生物工程有限公司; RNA 提取试剂盒购自上海飞捷生物技术有限公司; 反转录试剂盒购自天根生化科技有限公司; 2 $\times$ Hieff Canace[®] PCR Master Mix 高保真酶预混液、

Ni-NTA 琼脂糖纯化树脂购自舜圣生物科技有限公司; 同源重组酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; DNA 限制性内切酶、IPTG、PMSF、快速考马斯亮蓝染色液、ATP(100 mmol $\cdot$ L⁻¹)、RNA 酶抑制剂、Protein A+G Agarose (Fast Flow, for IP)、生物素快速标记试剂盒(Biotin-LC-NHS)、生物素标记蛋白 Pull-Down 试剂盒(Agarose Resin)购自碧云天生物技术有限公司; HA-Tag 兔单抗购自爱博泰克生物技术有限公司; Myc-Tag 鼠单抗和 Flag-Tag 鼠单抗购自艾比玛特生物医药有限公司; biotin 兔单抗购自 Cell Signaling Technology 公司。

1.3 主要溶液配制

Buffer A: 50 mmol $\cdot$ L⁻¹ NaH₂PO₄, 500 mmol $\cdot$ L⁻¹ NaCl, 40 mmol $\cdot$ L⁻¹ 咪唑,用纯水溶解后调节 pH 至 7.4,经 0.22 μ m 滤膜过滤备用; Buffer B: 50 mmol $\cdot$ L⁻¹ NaH₂PO₄, 500 mmol $\cdot$ L⁻¹ NaCl, 500 mmol $\cdot$ L⁻¹ 咪唑,用纯水溶解后调节 pH 至 7.4,经 0.22 μ m 滤膜过滤备用; Buffer C: 8 mol $\cdot$ L⁻¹ 尿素, 100 mmol $\cdot$ L⁻¹ NaH₂PO₄, 100 mmol $\cdot$ L⁻¹ Tris $\cdot$ HCl,用纯水溶解后调节 pH 至 7.4,经 0.22 μ m 滤膜过滤备用; Buffer D: 100 mmol $\cdot$ L⁻¹ NaH₂PO₄, 100 mmol $\cdot$ L⁻¹ Tris $\cdot$ HCl,用纯水溶解后调节 pH 至 7.4,经 0.22 μ m 滤膜过滤备用; Buffer E: 100 mmol $\cdot$ L⁻¹ NaH₂PO₄, 100 mmol $\cdot$ L⁻¹ Tris $\cdot$ HCl, 500 mmol $\cdot$ L⁻¹ 咪唑,用纯水溶解后调节 pH 至 4.5,经 0.22 μ m 滤膜过滤备用。

1.4 NSP12 蛋白生物信息学分析

从 NCBI 数据库获取 FIPV-DF2 毒株 NSP12 的氨基酸序列(GenBank: AFH55129.1:4029-4952),将该序列上传至 ExPASy PortParam、SOPMA、SWISS MODEL、NetPhos 3.1 Server、TMHMM 2.0 和 SignalP 6.0 在线网站,对其理化性质、结构、磷酸化位点、跨膜区等参数进行预测^[9]。

1.5 模板和引物合成

目的基因扩增、重组质粒鉴定以及酶活性试验所需的 RNA 模板和引物,均由天一辉远基因科技有限公司合成,具体序列见表 1。

1.6 重组质粒构建

将 FIPV-DF2 毒株感染 CRFK 细胞,待细胞出现明显病变后收集,使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,再通过反转录试剂盒扩增 cDNA。以该 cDNA 为模板,利用高保真酶和特异性的引物(表 1)扩增目的基因。PCR 反应结束后,取扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,并利用凝胶回收试剂盒

表 1 序列清单

Table 1 List of sequences

名称 Name	序列(5'→3') Sequence
pcDNA3. 1-NSP7-F	CTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCATGGATTACAAGGACGACGATGACAAGTC- TAAGCTGACCGAGATGA
pcDNA3. 1-NSP7-R	GATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTCTGCAGAAATGGTGG
pcDNA3. 1-NSP8-F	CTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCATGTACCCTTATGATGTGCCCCGACTATGC- CAGCGTGGCCAGC
pcDNA3. 1-NSP8-R	GATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTCTGCAGCTTGGTAG
pcDNA3. 1-NSP12-F	CTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCATGGAGCAAAAGCTCATTCTGAAGAGGA- CTTGCAGAGCTACCTGAACGAATGC
pcDNA3. 1-NSP12-R	GTTTAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGCTGCAGCACGGTGGAT
pcDNA3. 1通用引物-F	ATGGTGATGCGGTTTTGG
pcDNA3. 1通用引物-R	TGGCAACTAGAAGGCACAG
pET-30α-NSP7-F	TTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTCTAAGCTGACCGAGATGAAGTGTAC
pET-30α-NSP7-R	GTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTAATGGTGATGGTGATGATGCTGCAGAAATGGT- GGTGTTCTC
pET-30α-NSP8-F	TTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAGCGTGGCCAGCG
pET-30α-NSP8-R	GTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTAATGGTGATGGTGATGATGCTGCAGCTTGGT- AGTGCG
pET-30α-NSP12-F	TTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCAGAGCTACCTGAACGAATGC
pET-30α-NSP12-R	GTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTAATGGTGATGGTGATGATGCTGC
pET-30α通用引物-F	AGTAGTAGGTTGAGGCCGT
pET-30α通用引物-R	CCCCTCAAGACCCGTTT
RNA模板	UUUUUUUUUUAUAACUAAUCUCACAUAGC
RNA引物	FAM'-GCUAUGUGAGAUUAAGUUAU

回收目的基因片段,测定 DNA 浓度。将空载质粒于 37℃ 进行双酶切反应 15 min,反应产物经凝胶电泳鉴定并回收线性化载体,测定 DNA 浓度。将回收的目的基因和线性化空载按适当比例混合,利用同源重组酶于 37℃ 反应 30 min,随后置于 4℃ 保存备用。

1.7 重组产物转化和鉴定

取 10 μL 上述同源重组产物加入至 $\text{DH}_{5\alpha}$ 或 BL21(DE3)感受态细胞中,轻弹混匀,冰浴 30 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴热激 45 s,再冰浴 3 min;加入 900 μL LB 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 1 h,取 100 μL 菌液涂布于相应抗性的 LB 固体平板,倒置培养 12~16 h。挑取平板上生长的单克隆菌落进行 PCR 鉴定(引物见表 1),将鉴定为阳性的菌落送上海生物工程有限公司测序。

1.8 免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 试验

将测序验证正确的 pcDNA3.1-Flag-NSP7, pcDNA3.1-HA-NSP8 和 pcDNA3.1-Myc-NSP12

质粒转染至293T细胞,24 h后收集细胞,用IP裂解液裂解并离心取上清。取部分上清加入SDS-PAGE上样缓冲液,煮沸,作为Input样本;剩余上清加入相应标签的IP一抗(如抗Flag、HA、Myc抗体,按1:100稀释),4℃孵育过夜,次日再加入Protein A+G Agarose 4℃孵育4 h。孵育结束后,2 500 r·min⁻¹离心5 min,沉淀用PBS洗涤5次,最后加入SDS-PAGE上样缓冲液,煮沸,作为IP样本。样本可置于-20℃保存用于后续SDS-PAGE电泳检测。

1.9 间接免疫荧光试验(indirect immunofluorescence assay, IFA)

将 293T 细胞铺于 24 孔板,转染相应的质粒,24 h 后弃掉上清,用预冷 PBS 清洗 1 次;4% 多聚甲醛室温固定 20 min, PBS 清洗 3 次;0.4% Triton X-100 透膜 5 min, PBS 清洗 3 次;5% BSA 室温孵育 2 h, PBS 清洗 3 次;加入相应的一抗(1:1 000 Flag、HA、Myc)4℃孵育过夜, PBS 清洗 3 次;加入相应的

二抗室温孵育 2 h, PBS 清洗 3 次; DAPI 染色液孵育 5 min, PBS 清洗 3 次; 最后使用荧光显微镜观察蛋白共定位情况。

1.10 蛋白质体外结合 (pull-down) 试验

使用生物素标记试剂盒对纯化后的 NSP8 和 NSP12 蛋白进行标记, 去除游离生物素后调整蛋白浓度至 $0.5 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 备用。取 $50 \mu\text{L}$ 链霉亲和素琼脂糖树脂, 经 Binding Buffer 洗涤两次后, 与 $50 \mu\text{L}$ 生物素标记蛋白室温孵育 30 min, 离心收集树脂并洗涤; 加入 $250 \mu\text{L}$ Biotin Blocking Solution 封闭 8 min, 再用 Binding Buffer 洗涤 3 次; 分别加入 $200 \mu\text{L}$ 转染 Flag-NSP7 和 Myc-NSP12 质粒的 293T 细胞裂解液, 4°C 孵育 1 h, 经 Wash Buffer 洗涤 3 次去除未结合物, 洗涤液作为 Input 样本; 最后用 Elution Buffer 振荡洗脱 10 min, 收集洗脱液, 立即按 10:1 比例加入中和缓冲液, 作为 Pull-down 样本。样本置于 -20°C 保存用于后续 SDS-PAGE 电泳检测。

1.11 蛋白质免疫沉淀 (Western blot) 试验

将 Co-IP 和 Pull-down 试验获取的样本进行 15% SDS-PAGE 凝胶 (恒压 150 V); 待目的蛋白条带充分分离后, 通过半干转法 (恒流 150 mA, 转膜 60 min) 将蛋白转移至 NC 膜; 转膜结束后用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h; 加入经一抗稀释液稀释的一抗 (1:2 000 Flag、HA、Myc 和 1:1 000 biotin) 4°C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次 (每次 10 min), 加入相应 HRP 标记二抗室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次; 最后使用 ECL 化学发光显影液, 于化学发光成像系统采集信号。

1.12 RdRp 复合物的表达和纯化

取测序正确的 pET-30 α -HIS-NSP7, pET-30 α -HIS-NSP8 和 pET-30 α -HIS-NSP12 重组质粒过夜培养。首先进行小规模诱导表达, 将过夜培养菌液按 1:50 接种至含相应抗生素的 2 mL LB 培养基中, $225 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 4~5 h ($\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 0.6 \sim 0.8$), 加入 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG, 分别置于 37°C , $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 2 和 4 h, 25°C , $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 6 h, 以及 16°C , $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 16 h。收集菌体, 用无菌 PBS 洗涤 1 次, 按菌液体积: PBS = 10:1 重悬, 超声破碎至菌液澄清, $6 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 分别取全菌, 上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。根据结果选择最佳诱导条件进行大规模诱导表达, 收集菌体, 高压破碎后取上清或沉淀于 -80°C 保存备用。

NSP12 蛋白纯化^[10]: 将破碎上清经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 4°C 保存。使用 AKTA 蛋白纯化系统进行蛋白纯化, 首先用 20% 乙醇和纯水依次清洗管道, 设置流速为 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 安装镍柱, 注意不要产生气泡, 依次用 5 倍柱体积的 20% 乙醇、纯水、Buffer A 平衡柱子, 设置流速为 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 直至基线平稳; 将过滤后的上清样本从 A 管进样, 设置流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 上样结束后将 A 管置于 Buffer A 中, 冲洗杂蛋白, 直至基线平稳; A 管置于 Buffer A, B 管置于 Buffer B, 设置 Buffer B 含量 0%~100% 线性洗脱, 时间 20 min, 流速 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 根据 UV280 峰值收集洗脱蛋白, 收集后的样本置于 4°C 冰箱; 依次用 5 倍柱体积的 Buffer B、Buffer A、纯水和 20% 乙醇冲洗柱子和管道。

NSP7 和 NSP8 蛋白纯化^[11-12]: 将收集的沉淀重悬于 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素中, 室温混合孵育 1 h。取适量镍柱用 Buffer C 稀释, 将孵育后的沉淀 $10 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 4°C 离心 10 min, 取上清与镍柱共同孵育 30 min, 使蛋白与镍柱充分结合。冲洗 AKTA 仪器管道和安装镍柱同上, 然后用 Buffer C 平衡柱子和样本洗杂, 设置流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 直至基线平稳; 以 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度梯度复性 200 min, 其中 A 管放入 Buffer C 溶液中, B 管放入 Buffer D 溶液中, 设置 Buffer D 含量 0%~100%; 待复性程序结束, 以 100% Buffer D $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速运行一段时间, 直至基线平稳; A 管置于 Buffer E, B 管置于 Buffer D, 设置 Buffer D 含量 100%~0% 线性洗脱, 时间 20 min, 流速 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 根据 UV280 峰值收集洗脱蛋白, 收集后的样本置于 4°C 冰箱。将纯化后的蛋白用超滤管浓缩和透析, 并用 BCA 试剂盒测定浓度。

RdRp 复合物蛋白^[13-14]: 将纯化的 NSP7、NSP8 和 NSP12 以 1:2:1 的摩尔比在 4°C 孵育 4 h, 然后用 100 ku 超滤管进行浓缩, 置于 -80°C 备用。

1.13 基于凝胶方法测定 RdRp 酶活性

RdRp 酶活性检测参考文献 [15-16]。将合成的 RNA 引物和模板分别溶解于缓冲液 ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.0) 中, 终浓度 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将模板和引物 1:1 混合, 95°C 变性 5 min。取 $1 \mu\text{L}$ 模板-引物混合液, $1 \mu\text{L}$ ATP ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), $4.0 \mu\text{L}$ RdRp 复合物 ($125 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 和 $4.0 \mu\text{L}$ RdRp 反应缓冲液 [$40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris (pH 8.0), $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

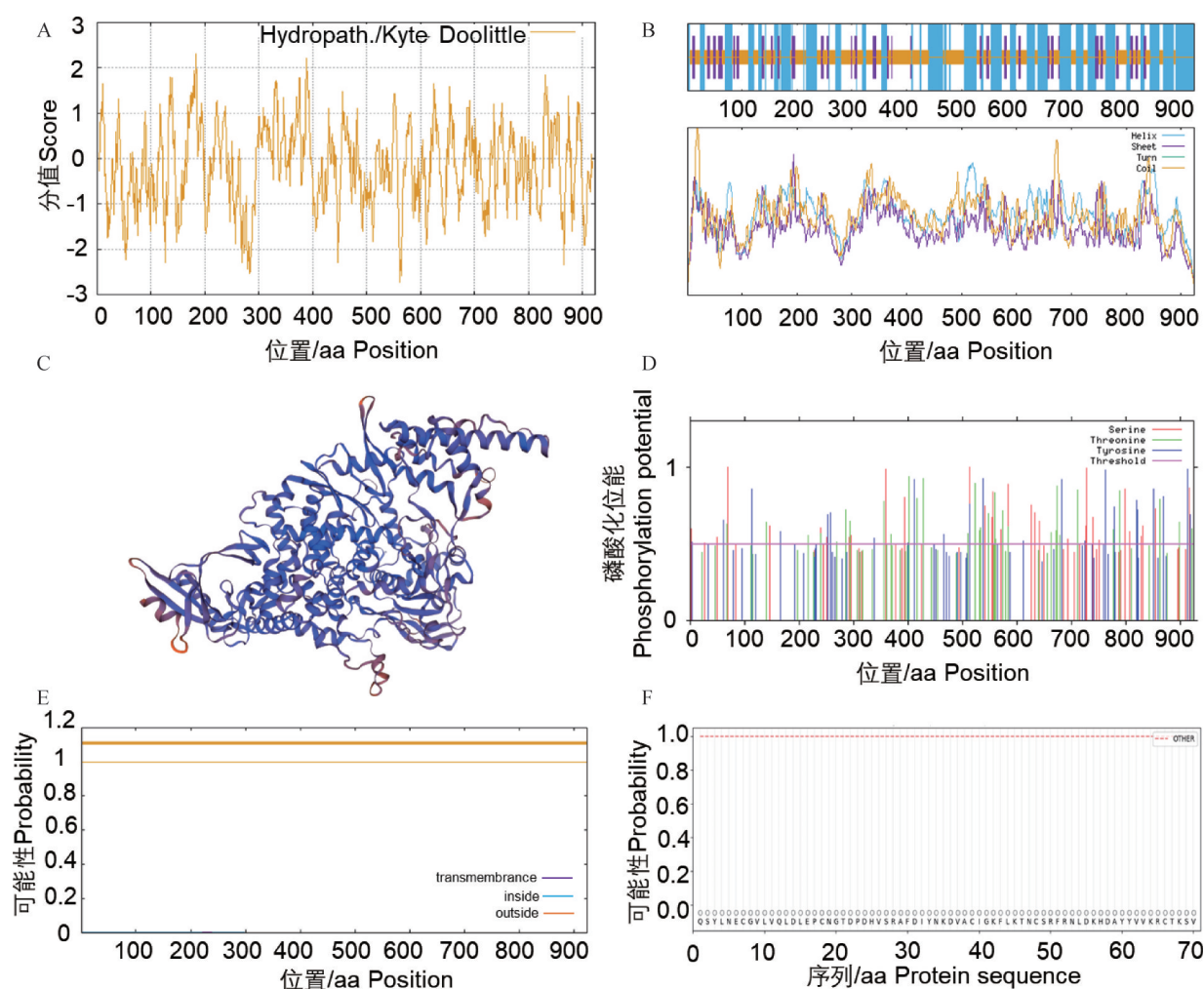
BSA, $1.5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ RNase 抑制剂] 配成 $10 \mu\text{L}$ RdRp 酶活性反应体系, 37°C 孵育 1 h 。反应结束后加入 $2 \times \text{Urea-TBE}$ 上样缓冲液, 95°C 加热 1 min , 随后上样至 20% Urea-PAGE 变性胶, 150 V 电泳 1.5 h , 在凝胶成像仪上进行成像。

2 结果

2.1 FIPV-DF2 毒株的 NSP12 蛋白生物信息学分析

FIPV-DF2 毒株的 NSP12 基因全长大小为 $2\,772 \text{ bp}$, 编码 923 个氨基酸。ExPASy ProtParam 预测结果显示, NSP12 的相对分子质量为 104.954 ku ,

分子式为 $\text{C}_{4717}\text{H}_{7161}\text{N}_{1209}\text{O}_{1393}\text{S}_{58}$, 等电点为 5.69 , 脂肪系数为 78.35 , 消光系数 (280 nm) 为 $133\,910$, 不稳定系数为 30.51 , 平均亲水性为 -0.179 (图 1A), 表明该蛋白是一种稳定的亲水性蛋白。SOPMA 预测 NSP12 的二级结构包括 43.51% 的 α 螺旋、 11.47% 延伸链和 45.02% 的无规则卷曲 (图 1B)。SWISS MODEL 预测 NSP12 的三级结构如图 1C 所示, 其全球模型质量估测 (global model quality estimate, GMQE) 为 0.88 , 定性模型能量分析 (qualitative model energy analysis, QMEAN) 为 -2.36 , 说明预测的三维结构准确性较高且误差较小。NetPhos 3.1



A. NSP12 蛋白亲/疏水性分析; B. NSP12 蛋白二级结构预测; C. NSP12 蛋白三级结构预测; D. NSP12 蛋白磷酸化位点预测; E. NSP12 蛋白跨膜结构预测; F. NSP12 蛋白信号肽预测

A. Hydrophilic/hydrophobic analysis of NSP12 protein; B. Secondary structure prediction of NSP12 protein; C. Tertiary structure prediction of NSP12 protein; D. Phosphorylation sites prediction of NSP12 protein; E. Transmembrane structure prediction of NSP12 protein; F. Signal peptide prediction of NSP12 protein

图 1 FIPV-DF2 毒株 NSP12 蛋白的生物信息学分析

Fig. 1 Bioinformatics analysis of NSP12 protein from the FIPV-DF2 strain

Server 预测显示, NSP12 共有 90 个磷酸化位点, 分别为 32 个丝氨酸(serine)、26 个酪氨酸(tryosine)和 32 个苏氨酸(threonine)(图 1D)。TMHMM 2.0 和 SignalP 6.0 预测表明, NSP12 蛋白为非跨膜蛋白(图 1E)且无信号肽(图 1F)。

2.2 NSP7、NSP8 和 NSP12 重组质粒构建及表达

为探究 NSP7、NSP8 和 NSP12 之间的相互作用, 本研究首先构建了 pcDNA3.1-Flag-NSP7(图 2A)、pcDNA3.1-HA-NSP8(图 2B)和 pcDNA3.1-Myc-NSP12(图 2C)重组质粒。将空载及各重组质粒转染至 293T 细胞中, 24 h 后收集细胞, 通过 Western blot 检测蛋白表达情况。结果显示, 所有重组质粒均构建成功, 并能正确表达相应目标蛋白, NSP7 蛋白大小为 10 ku(图 2D), NSP8 蛋白大小为 23 ku(图 2E), NSP12 蛋白大小为 105 ku(图 2F)。

2.3 NSP7、NSP8 和 NSP12 之间存在相互作用

为深入探究 NSP7、NSP8 和 NSP12 之间的相互作用, 将相应重组质粒转染至 293T 细胞中, 24 h 后收集样本进行 Co-IP 试验。结果显示, 免疫沉淀 NSP12、NSP7 和 NSP8 水平明显升高(图 3A); 免疫沉淀 NSP8、NSP7 和 NSP12 水平明显升高(图 3B); 同样, 免疫沉淀 NSP7、NSP8 和 NSP12 水平明显升高(图 3C)。Pull-down 试验结果表明, biotin 标记的 NSP12 可特异性沉淀 NSP7(图 3D); biotin 标记的 NSP8 可特异性沉淀 NSP12 和 NSP7(图 3E~F)。进一步通过 IFA 试验观察 NSP7、NSP8 和 NSP12 的细胞定位情况, 结果显示, NSP8 和 NSP12 主要在细胞质中表达, 而 NSP7 在细胞质和细胞核中均有表达, 三者之间存在明显的共定位现象(图 3G~I)。以上结果共同证明, NSP7、NSP8 和 NSP12 之间存在直接相互作用。

2.4 NSP7、NSP8 和 NSP12 原核表达重组质粒构建及鉴定

本研究已证实 FIPV-DF2 毒株的 NSP7、NSP8 和 NSP12 蛋白之间存在相互作用。为进一步应用于 RdRp 酶活性研究, 分别构建 NSP7、NSP8 和 NSP12 的原核表达重组质粒。首先, 使用特异性引物对 FIPV-DF2 毒株的 NSP7、NSP8 和 NSP12 基因进行 PCR 扩增, 片段大小分别为 249 bp(图 4A)、585 bp(图 4B)和 2 772 bp(图 4C), 均符合预期。将上述基因片段分别连接至 pET-30 α -HIS 载体, 经 PCR 鉴定与测序验证, 成功构建 NSP7(图 4D)、NSP8(图 4E)和 NSP12(图 4F)原核表达载体。

2.5 NSP7、NSP8 和 NSP12 蛋白诱导表达及纯化

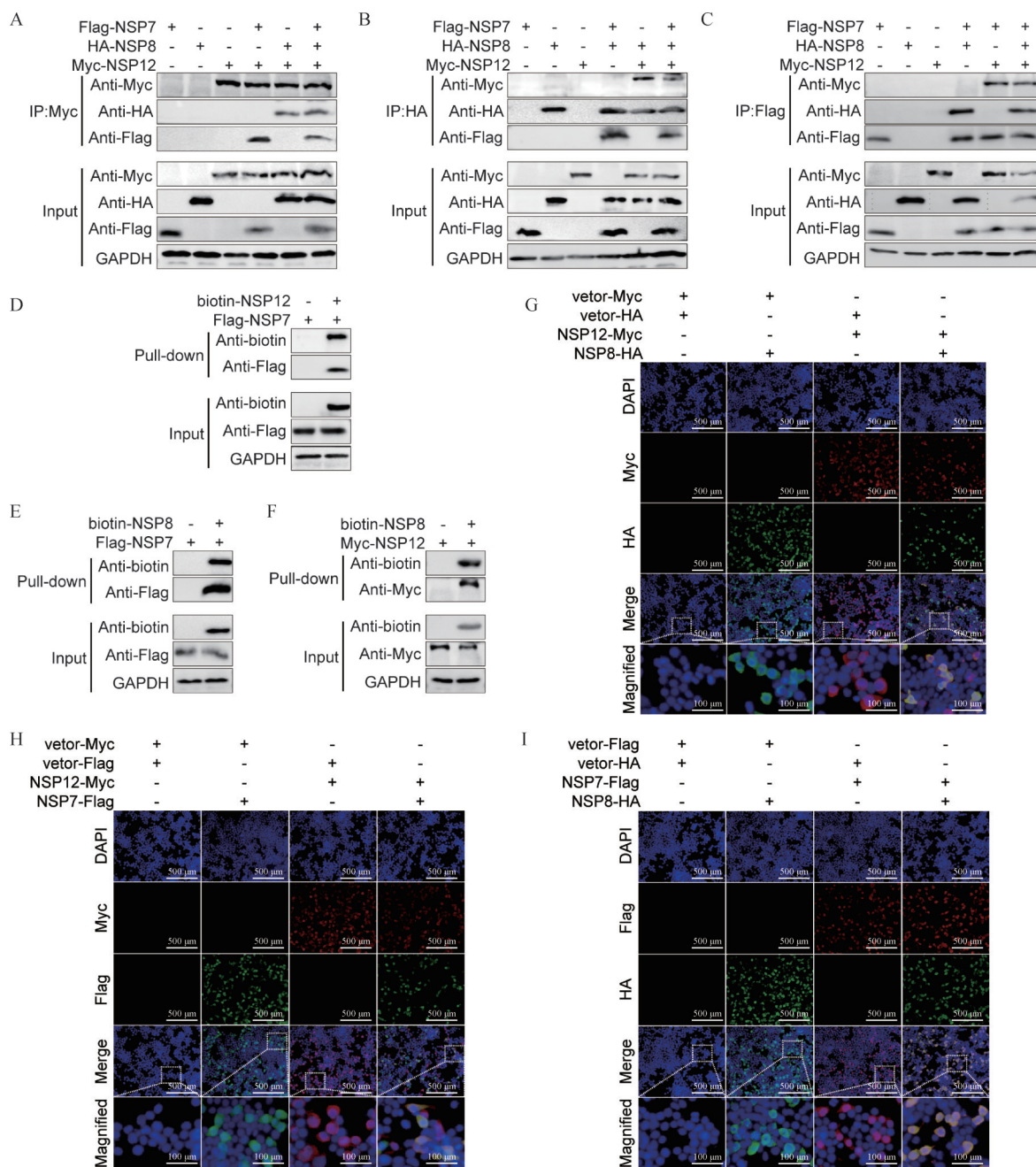
为获得纯化的 NSP7、NSP8 和 NSP12 蛋白, 首先对诱导表达条件进行优化。将测序正确的原核表达重组质粒转化至大肠杆菌, 在不同温度和时间下诱导表达, 超声破碎后分别收集全菌、上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 电泳分析。结果显示, NSP7 和 NSP8 在 37 °C 诱导 2、4 h 和 25 °C 诱导 6 h 的包涵体中均表达, 其中 25 °C 诱导 6 h 的包涵体中蛋白表达量较高且杂蛋白较少, 更利于后续纯化, 因此最终选择在 1 mmol·L⁻¹ IPTG, 25 °C, 6 h 条件下诱导表达 NSP7 和 NSP8(图 5A、B)。NSP12 在 37 °C 诱导 2、4 h 和 25 °C 诱导 6 h 的包涵体中表达, 在 16 °C 诱导 15 h 的上清中表达, 考虑到包涵体纯化可能会影响蛋白活性, 为保证后续 RdRp 酶活性的稳定, 选择在 1 mmol·L⁻¹ IPTG, 16 °C, 15 h 条件下诱导表达 NSP12(图 5C)。按上述优化条件进行诱导表达, 并利用镍柱亲和层析分别纯化 NSP7、NSP8 和 NSP12 蛋白。SDS-PAGE 结果显示, NSP7、NSP8 和 NSP12 蛋白大小分别为 10、23 和 105 ku(图 5D), 均与预期一致, 表明目的蛋白已成功纯化。为获得 RdRp 复合物, 将纯化后的 NSP7、NSP8 和 NSP12 蛋白按比例共同孵育, 再经 100 ku 超滤管浓缩, 最终获得含有 3 种蛋白组分的 RdRp 复合物(图 5D)。

2.6 FIPV-DF2-RdRp 酶活性试验

为验证 RdRp 复合物的酶活性, 本研究建立了基于凝胶的检测方法, 产生的延伸 RNA 链越多, 代表酶活性越高。结果显示, 单独的 NSP12 蛋白无法发挥酶活性, 未检测到 RNA 延伸链; 而由 NSP7、NSP8 和 NSP12 共同组成的 RdRp 复合物则能有效延伸 RNA 链(图 6)。以上结果表明, 本研究通过原核表达系统成功纯化出具有酶活性的 RdRp 复合体。

3 讨 论

FIPV 作为 FCoV 的高致死性变异株, 是引发 FIP 的唯一病原体。FIPV 的致病机制复杂, 其突破肠道局限、感染单核/巨噬细胞的能力与病毒变异(如 3c 基因缺失、S 蛋白突变)密切相关^[17-18]。然而, 其核心复制机制, 尤其是 NSP12 与辅助因子 NSP7/NSP8 的协同作用长期未被阐明, 严重制约了抗病毒策略的开发。本研究首次系统揭示了 FIPV-DF2 毒株 NSP12 的分子特性、其与 NSP7/NSP8 的相互作用模式, 以及 RdRp 复合物的功能依赖性, 为靶向

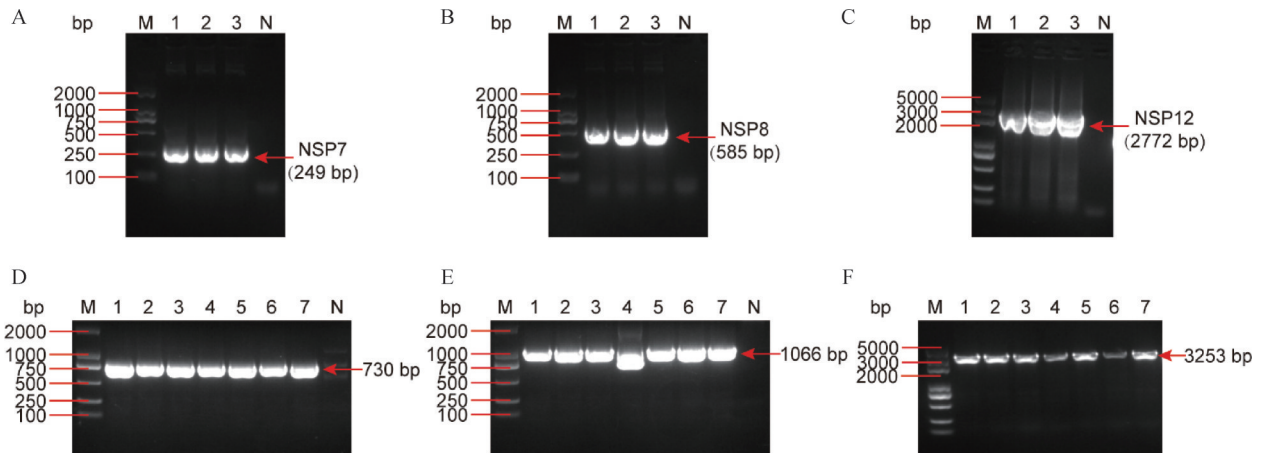


A. Co-IP检测 NSP12与 NSP7、NSP8的相互作用;B. Co-IP检测 NSP8与 NSP7、NSP12的相互作用;C. Co-IP检测 NSP7与 NSP8、NSP12的相互作用;D. Pull-down检测 NSP7和 NSP12的直接相互作用;E. Pull-down检测 NSP7和 NSP8的直接相互作用;F. Pull-down检测 NSP8和 NSP12的直接相互作用;G. IFA检测 NSP8和 NSP12的共定位;H. IFA检测 NSP7和 NSP12的共定位;I. IFA检测 NSP7和 NSP8的共定位。图 G~I中,第 1-4 行分图标尺=500 μm,第 5 行分图标尺=100 μm

A. The interaction between NSP12 and NSP7 or NSP8 was evaluated by Co-IP; B. The interaction between NSP8 and NSP7 or NSP12 was evaluated by Co-IP; C. The interaction between NSP7 and NSP8 or NSP12 was evaluated by Co-IP; D. The direct interaction between NSP7 and NSP12 was evaluated by Pull-down; E. The direct interaction between NSP7 and NSP8 was evaluated by Pull-down; F. The direct interaction between NSP8 and NSP12 was evaluated by Pull-down; G. The colocalization of NSP8 and NSP12 was evaluated by IFA; H. The colocalization of NSP7 and NSP12 was evaluated by IFA; I. The colocalization of NSP7 and NSP8 was evaluated by IFA. In Figures G to I, the scale bar for the first four rows is 500 μm, and the scale bar for the fifth row is 100 μm

图 3 NSP7、NSP8和 NSP12之间的相互作用

Fig. 3 Interactions of NSP7, NSP8, and NSP12



A. *NSP7* 基因片段扩增(1~3. *NSP7* 基因片段); B. *NSP8* 基因片段扩增(1~3. *NSP8* 基因片段); C. *NSP12* 基因片段扩增(1~3. *NSP12* 基因片段); D. *NSP7* 重组质粒的菌落 PCR 鉴定(1~7. *NSP7* 阳性克隆); E. *NSP8* 重组质粒的菌落 PCR 鉴定(1~7. *NSP8* 阳性克隆); F. *NSP12* 重组质粒的菌落 PCR 鉴定(1~7. *NSP12* 阳性克隆); M. DNA 分子质量标准; N. 阴性对照

A. Amplification of the *NSP7* gene fragment (1-3. *NSP7* gene fragment); B. Amplification of the *NSP8* gene fragment (1-3. *NSP8* gene fragment); C. Amplification of the *NSP12* gene fragment (1-3. *NSP12* gene fragment); D. Colony PCR identification of the *NSP7* recombinant plasmid (1-7. *NSP7* positive clones); E. Colony PCR identification of the *NSP8* recombinant plasmid (1-7. *NSP8* positive clones); F. Colony PCR identification of the *NSP12* recombinant plasmid (1-7. *NSP12* positive clones); M. DNA marker; N. Negative control

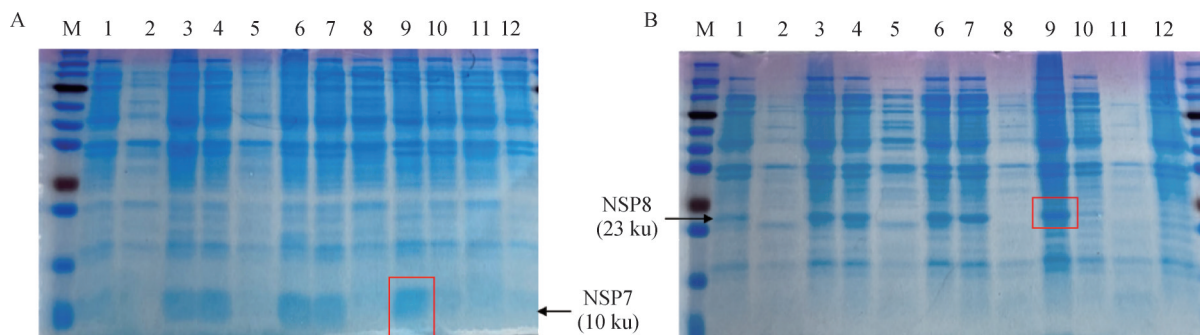
图4 *NSP7*、*NSP8*和*NSP12*基因扩增及重组质粒构建

Fig. 4 Amplification of *NSP7*, *NSP8* and *NSP12* genes and construction of recombinant plasmids

该复合物的药物设计提供了理论与技术基础。

生物信息学分析表明, FIPV-DF2 *NSP12* 为稳定的亲水性蛋白, 其二级结构以 α 螺旋(43.51%)和无规则卷曲(45.02%)为主, 与 SARS-CoV-2 *NSP12* 的预测结构相似^[19], 提示其在 RdRp 催化核心中可能通过柔性区域与辅助因子动态结合。值得注意的是, NetPhos 预测结果显示, 该蛋白含有 90 个磷酸化位点(32 个 Ser、32 个 Thr、26 个 Tyr), 显著多于其他冠状病毒(如 SARS-CoV-2-*NSP12* 约含 79 个磷酸化位点)^[19], 暗示 FIPV *NSP12* 的活性可

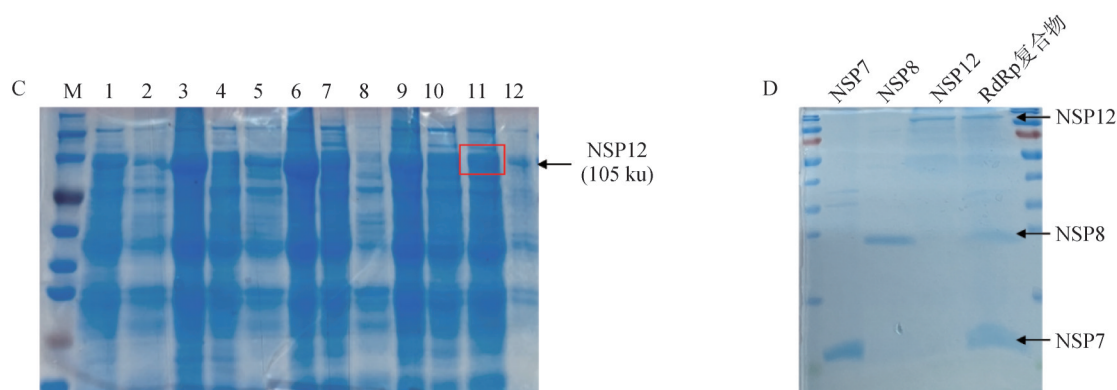
能受到更复杂的翻译后调控。已有研究表明, 磷酸化可通过调节 RdRp 的亚细胞定位或复合体组装效率影响病毒复制^[20-21]。例如, 登革病毒 NS5 蛋白的磷酸化修饰可增强其与宿主因子的结合, 进而促进复制复合体形成^[22]。此外, 宿主激酶(如 PKR、JNK)也可能通过磷酸化 *NSP12* 参与抗病毒通路的激活。例如, 猪流行性腹泻病毒 *NSP12* 可与宿主 E3 泛素连接酶 RNF7 相互作用, 其泛素化修饰可抑制病毒复制^[23]。因此, FIPV *NSP12* 所具备的多个磷酸化位点可能通过类似机制调控 RdRp 活性, 或



(图5 Fig.5)

(转下页 Carried forward)

(续图 5 Continued)

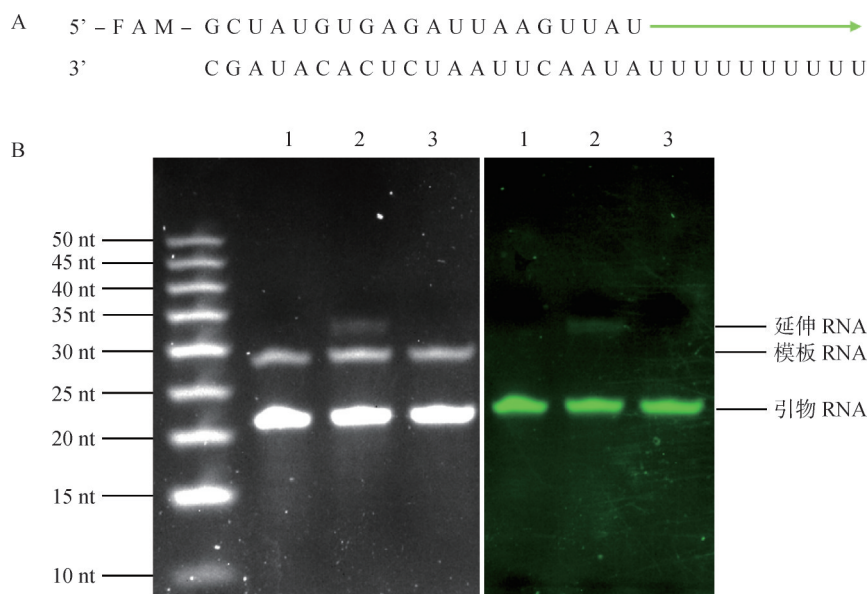


A. 不同诱导条件下 NSP7 蛋白表达; B. 不同诱导条件下 NSP8 蛋白表达; C. 不同诱导条件下 NSP12 蛋白表达; D. SDS-PAGE 检测 NSP7、NSP8、NSP12 和 RdRp 复合物蛋白。M. 蛋白相对质量标准; 1~3. 37 °C, 2 h, 220 r·min⁻¹ 诱导表达后的全菌、上清、沉淀; 4~6. 37 °C, 4 h, 220 r·min⁻¹ 诱导表达后的全菌、上清、沉淀; 7~9. 25 °C, 6 h, 220 r·min⁻¹ 诱导表达后的全菌、上清、沉淀; 10~12. 16 °C, 15 h, 180 r·min⁻¹ 诱导表达后的全菌、上清、沉淀

A. Expression of NSP7 protein under different induction conditions; B. Expression of NSP8 protein under different induction conditions; C. Expression of NSP12 protein under different induction conditions; D. Detection of NSP7, NSP8, NSP12 and RdRp complex proteins by SDS-PAGE; M. Protein marker; 1-3. Samples of whole-cell lysate, supernatant, and pellet fractions collected after induction at 37 °C for 2 h (220 r·min⁻¹); 4-6. Samples of whole-cell lysate, supernatant, and pellet fractions collected after induction at 37 °C for 4 h (220 r·min⁻¹); 7-9. Samples of whole-cell lysate, supernatant, and pellet fractions collected after induction at 25 °C for 6 h (220 r·min⁻¹); 10-12. Samples of whole-cell lysate, supernatant, and pellet fractions collected after induction at 16 °C for 15 h (180 r·min⁻¹)

图 5 NSP7、NSP8、NSP12 和 RdRp 复合物蛋白纯化

Fig. 5 Purification of NSP7, NSP8, NSP12 and RdRp complex proteins



A. 引物-模板和 RdRp 复合物延伸示意图; B 左. RNA 染料检测 RNA 延伸链; B 右. 荧光检测 RNA 延伸链; 1. 仅含引物-模板; 2. 引物-模板和 RdRp 复合物; 3. 引物-模板和 NSP12 蛋白

A. Schematic diagram of primer-template extension by the RdRp complex; B left. Detection of RNA extension products by RNA dye staining; B right. Fluorescence-based detection of RNA extension products; 1. Only primer-template; 2. Primer-template and RdRp complex; 3. Primer-template and NSP12 protein

图 6 RdRp 酶活性试验

Fig. 6 RdRp enzyme activity assay

成为宿主抗病毒信号的潜在作用靶点。

本研究通过 Co-IP、Pull-down 和 IFA 试验证实, FIPV NSP12 与 NSP7、NSP8 在 293T 细胞中能够形成稳定复合物, 且三者主要共定位于细胞质。该结果与 SARS-CoV-2、SARS-CoV 中的相关研究一致^[6-7], NSP7 和 NSP8 通过增强 NSP12 的模板结合能力与持续合成能力, 显著提升 RdRp 活性。体外酶活试验进一步表明, 仅当 NSP7、NSP8 与 NSP12 共同存在时, 复合物才具备 RNA 链延伸能力, 而单独 NSP12 无催化活性。这与冠状病毒 RdRp 的作用机制相符, 即 NSP7 和 NSP8 作为分子伴侣, 可通过稳定 NSP12 的“右手”结构域并促进模板-引物双链的解旋, 从而激活其聚合酶功能^[7, 24]。然而, FIPV RdRp 对辅助因子的依赖性可能更强, SARS-CoV-2 NSP12 在体外可表现出较低水平的本底活性^[6], 而本研究中 FIPV NSP12 单独存在时未检测到活性, 其原因可能与 FIPV NSP7 和 NSP8 本身可形成三聚体并在体外表现出一定活性有关^[25]。

本研究成功通过原核表达系统制备了纯化的 NSP7、NSP8 和 NSP12 蛋白, 并利用超滤浓缩法获得了具有功能的 RdRp 复合物。值得注意的是, NSP7 和 NSP8 在原核表达中主要以包涵体形式存在, 需通过变性步骤进行纯化。包涵体的形成通常与蛋白的疏水区域暴露或结构复杂性较高有关^[26-27], NSP7 和 NSP8 作为冠状病毒复制复合物的辅助因子, 可能含有疏水界面, 或需依赖与 NSP12 的相互作用以维持其天然构象。例如, SARS-CoV-2 的 NSP7 和 NSP8 在单独表达时也易形成包涵体^[28], 说明其可溶性表达需要 NSP12 的辅助。相比之下, NSP12 在低温诱导条件下可实现部分可溶性表达, 这可能与整体亲水性强, 二级结构中 α 螺旋与无规则卷曲占主导, 减少了疏水核心的暴露和聚集倾向有关^[29]。此外, NSP12 中较高的无规则卷曲比例也增加其构象灵活性, 低温诱导通过减缓蛋白合成速率, 使这些柔性区域逐步折叠, 从而避免因快速聚集形成包涵体^[30]。

4 结 论

本研究系统阐明了 FIPV-DF2 NSP12 的分子特性及其与 NSP7/NSP8 的相互作用机制, 成功构建了具有酶活性的 RdRp 复合物, 并建立了相应的体外酶活性检测体系。结果表明, NSP12 本身不具

备催化活性, 只有在与 NSP7 和 NSP8 共同组成复合物后, 才能发挥 RdRp 功能。这些发现不仅深化了对 FIPV 复制机制的理解, 也为开发靶向 RdRp 的抗 FIP 药物奠定了关键基础。

参考文献 (References):

- [1] WANG Y T, HSIEH L E, DAI Y R, et al. Polymorphisms in the feline TNFA and CD209 genes are associated with the outcome of feline coronavirus infection[J]. *Vet Res*, 2014, 45(1):123.
- [2] IZES A M, YU J, NORRIS J M, et al. Current status on treatment options for feline infectious peritonitis and SARS-CoV-2 positive cats [J]. *Vet Quart*, 2020, 40(1):322-330.
- [3] YAN L, GE J, ZHENG L, et al. Cryo-EM Structure of an extended SARS-CoV-2 replication and transcription complex reveals an intermediate state in cap synthesis[J]. *Cell*, 2021, 184(1):184-193.
- [4] PATHANIA S, RAWAL R K, SINGH P K. RdRp (RNA-dependent RNA polymerase): a key target providing anti-virals for the management of various viral diseases[J]. *Mol Struct*, 2022, 1250:131756.
- [5] JIANG Y, YIN W, XU H E. RNA-dependent RNA polymerase: structure, mechanism, and drug discovery for COVID-19 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 538:47-53.
- [6] SINGH D, KUSHWAHA T, KULANDAISAMY R, et al. Redefining NSP12 activity in SARS-CoV-2 and its regulation by NSP8 and NSP7 [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2025, 36(1):102452.
- [7] KIRCHDOERFER R N, WARD A B. Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):2342.
- [8] XIA H, LI X, ZHAO W, et al. Adaptive evolution of feline coronavirus genes based on selection analysis [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020:9089768.
- [9] 荆婷婷, 尹 号, 黄 蓉, 等. 牛支原体 0580 基因 C 端截短体的原核表达及生物学功能初步分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54(7):2991-3001.
JING T T, YIN H, HUANG R, et al. Prokaryotic expression and biological function analysis of *Mycoplasma bovis* 0580 gene C-terminal truncated [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2023, 54(7):2991-3001. (in Chinese)

- [10] 程 彤. 人源诺如病毒 RNA 聚合酶复制分子机制及抗病毒益生菌筛选研究 [D]. 西安:陕西科技大学, 2021.
- CHENG T. Study of the replication molecular mechanism and antiviral probiotics screening of human norovirus RNA polymerase [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2021. (in Chinese)
- [11] 何 伟. 重组大肠杆菌表达包涵体药物蛋白的复性与纯化研究 [D]. 上海:华东理工大学, 2017.
- HE W. Study on the renaturation and purification of pharmaceutical protein expressed as inclusion body in recombinant *E. coli* [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2017. (in Chinese)
- [12] 伍晶星. 藏羚羊和岩羊朊蛋白基因分析及五种动物重组朊蛋白在 RT-QuIC 中的应用 [D]. 北京:中国疾病预防控制中心, 2021.
- WU J X. Analysis of prion protein genes in tibetan antelope and blue sheep, and the application of recombinant prion proteins from five animal species in RT-QuIC [D]. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2021. (in Chinese)
- [13] PODADERA A, CAMPO L, REHMAN F, et al. Optimized recombinant expression and purification of the SARS-CoV-2 polymerase complex [J]. *Curr Protoc*, 2024, 4(3):e1007.
- [14] 李文康. 棉酚靶向 RNA 依赖的 RNA 聚合酶广谱抑制冠状病毒的机制研究 [D]. 北京:中国农业科学院, 2023.
- LI W K. Mechanism of gossypol inhibiting coronaviruses by targeting RNA-dependent RNA polymerase [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2023. (in Chinese)
- [15] YIN W, LUAN X, LI Z, et al. Structural basis for inhibition of the SARS-CoV-2 RNA polymerase by suramin [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2021, 28 (3) : 319-25.
- [16] MATYUGINA E, PETUSHKOV I, SURZHIKOV S, et al. Nucleoside analogs that inhibit SARS-CoV-2 replication by blocking interaction of virus polymerase with RNA [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4):3361.
- [17] TEKES G, THIEL H J. Feline coronaviruses: pathogenesis of feline infectious peritonitis [J]. *Adv Virus Res*, 2016, 96:193-218.
- [18] KENNEDY M A. Feline infectious peritonitis: update on pathogenesis, diagnostics, and treatment [J]. *Vet Clin N Am-small*, 2020, 50(5):1001-1011.
- [19] 陈 柯, 闫 硕, 宋桃花, 等. 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 [J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(1):9-13.
- CHEN K, YAN S, SONG T H, et al. Prokaryotic expression, polyclonal antibody preparation, and bioinformatic analysis of the SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase [J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2022, 17(1):9-13. (in Chinese)
- [20] JAKUBIEC A, TOURNIER V, DRUGEON G, et al. Phosphorylation of viral RNA-dependent RNA polymerase and its role in replication of a plus-strand RNA virus [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (30) : 21236-21249.
- [21] DUFLOS C, MICHELIS T. Regulation of viral RNA-dependent RNA polymerases by phosphorylation [J/OL]. *Front Virol*, 2023 (3) : fviro-03-1176840. [2025-11-21]. <https://www.frontiersin.org/journals/virology/articles/10.3389/fviro.2023.1176840/full>.
- [22] NOPPAKUNMONGKOLCHAI W, POYOMTIP T, JITTAWUTTIPOKA T, et al. Inhibition of protein kinase C promotes dengue virus replication [J]. *J Virol*, 2016, 13:35.
- [23] 李慧春. 猪流行性腹泻病毒 Nsp12 互作蛋白的鉴定及作用分析 [D]. 北京:中国农业科学院, 2018.
- LI H C. Identification and functional analysis of proteins interacting with porcine epidemic diarrhea virus Nsp12 [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018. (in Chinese)
- [24] SAVILLE J W, BEREZUK A M, SRIVASTAVA S S, et al. Three-dimensional visualization of viral structure, entry, and replication underlying the spread of SARS-CoV-2 [J]. *Chem Rev*, 2022, 122 (17) : 14066-14084.
- [25] XIAO Y, MA Q, RESTLE T, et al. Nonstructural proteins 7 and 8 of feline coronavirus form a 2:1 heterotrimer that exhibits primer-independent RNA polymerase activity [J]. *J Virol*, 2012, 86 (8) : 4444-4454.
- [26] DYSON M R, SHADBOLT S P, VINCENT K J, et al. Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: identification of protein features that correlate with successful expression [J]. *BMC*

- Biotechnol*,2004,4:32.
- [27] GRABARZ F, LOPES A P Y, BARBOSA F F, et al. Strategies for the production of soluble interferon- α consensus and potential application in arboviruses and SARS-CoV-2[J]. *Life-Basel*, 2021, 11(6):460.
- [28] WILAMOWSKI M, HAMMEL M, LEITE W, et al. Transient and stabilized complexes of Nsp7, Nsp8, and Nsp12 in SARS-CoV-2 replication [J]. *Biophys J*, 2021, 120(15):3152-3165.
- [29] MAO R, XIONG G, ZHENG H, et al. Effect of ultrasound on the functional properties and structural changes of chicken liver insoluble proteins isolated by isoelectric solubilization/precipitation [J]. *Ultrason Sonochem*, 2025, 112:107165.
- [30] KIM M J, PARK H S, SEO K H, et al. Complete solubilization and purification of recombinant human growth hormone produced in *Escherichia coli* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2):e56168.

(编辑 白永平)