

参赛队员姓名：刘奕飞

中学：北京师范大学附属实验中学

省份：北京

国家/地区：中国

指导教师姓名：饶子和、李晓辉

指导教师单位：清华大学医学院
北京师范大学附属实验中学

论文题目：新冠病毒聚合酶 Nsp12 的制备和表达条件的优化

新冠病毒聚合酶 Nsp12 的制备和表达条件的优化

刘奕飞

【摘要】 新型冠状病毒肺炎疫情在全球流行，是近一个世纪以来对全人类影响最大的传染病之一，对世界产生了空前的影响。同 2003 年的 SARS 病毒相比，新冠病毒有着更长的潜伏期与更强的传染能力^[1]，在这一过程中病毒的复制转录系统承担着重要的作用。对于冠状病毒家族成员，转录复制系统的核心是其非结构蛋白中的 Nsp12，功能上属于 RNA 依赖的 RNA 聚合酶，该蛋白被认为是抗冠状病毒药物开发的关键药物靶点^[2-4]。值此疫情肆虐全球目前又无特效药之际，如何获得大量高纯度的 Nsp12 蛋白是对推进后续研究极有现实意义的课题。本研究旨在摸索新冠病毒 Nsp12 的制备纯化条件，通过优化条件制备出足够的高纯度的 Nsp12 蛋白，为后续的新冠复制机制的探究、开发抗新冠肺炎的特效药及药物的筛选奠定基础。

【关键词】 新冠病毒 (SARS-COV-2); RNA 聚合酶 (RNA polymerase); 蛋白表达和纯化 (expression and purification of protein)

目 录

摘要	1
关键词.....	1
背景	3
材料与amp;方法.....	4
结果	8
讨论	10
结论	12
研究工作创新性.....	12
参考文献	13
致谢	15
学术诚信声明	16

背景

新冠病毒 Nsp12 蛋白是转录复制的核心成分^[4]，高纯度的 Nsp12 蛋白对于开展新冠研究是必不可少的生物材料，例如对于新冠病毒转录复制复合体结构的解析、以及靶向 Nsp12 的特效药筛选，而 Nsp12 蛋白的表达纯化有着较高的难度，主要体现在 Nsp12 的纯化过程中有一类杂蛋白和 Nsp12 性质相似，结合紧密，现有的纯化手段难以将其去除，导致获取足够量的、高纯度的 Nsp12 蛋白十分困难。

我们团队曾通过改变诱导温度，诱导剂浓度，菌液浓度等一系列条件进行尝试，而杂蛋白无法被去除这一现象均没有明显的改善。实验室常规的对菌液诱导降温的手段是冰浴降温，在一次 Nsp12 纯化实验中，由于制冰机的故障我选择使用摇床自带的降温系统进行降温，通过后续的电泳，我发现杂蛋白的量大大减少（图 1），极大地增加了 Nsp12 蛋白的产量，由于本次实验其余条件均和之前的操作保持一致，因此我猜测是由于降温手段的改变对于杂蛋白的产量有明显的影响。接下来我对这一现象展开探究。



图 1. 通过改变降温方式，其他纯化条件都保持不变时，从镍柱上洗脱下来的蛋白样品中杂蛋白的比例大大减少

通过质谱实验的鉴定，该杂蛋白为一类名为 arnA 的蛋白质，属于革兰氏阴性菌中的一种双功能酶，能够对其细胞壁上脂多糖中的 lipid A 进行修饰，这一修饰是革兰氏阴性菌对部分抗生素耐受的结构基础^[5]，而 lipid A 是脂多糖能够锚定在细菌的外膜上的重要结构，对于细胞膜流动性有着重要影响，相比于组成脂多糖的其他部分，lipid A 的结构和修饰非常保守。有研究表明，耐

冷的菌株中脂多糖构成与正常菌株有着较大的差异，主要体现在不饱和程度高，密度更大，这保证了低温下细胞膜的流动性^[6]，在大肠杆菌经过低温刺激后，脂多糖的成分发生较大的变化^[7]。因此我们大胆猜测，冰浴降温属于较为剧烈的低温刺激，由此带来了其表面脂多糖的成分更新来保证细胞膜流动性，属于细菌的应激反应，而脂多糖成分的更新诱导了其所需的修饰蛋白 arnA 的表达上调，同时 arnA 与我们的目的蛋白 Nsp12 有着较强的结合能力，因此才产生上述纯化难题。

因此，我们设计实验，尝试探究不同降温手段对杂蛋白产量和性质的影响。并证实了摇床的空气制冷系统所带来的较为温和的降温手段降低了杂蛋白 arnA 的产量，并改变了其性质，使其与 Nsp12 的结合没有那么紧密，改善了 Nsp12 的纯化效果。

材料与方法

一、材料

主要试剂与仪器

1.1 主要试剂

表 1 实验主要试剂

药品名称	生产厂家
LB 培养基混合粉末	北京化工厂
质粒小提试剂盒:	诺唯赞
胶回收试剂盒:	诺唯赞
琼脂糖	Titan
T4DNA 连接酶:	NEB
DNA 限制性内切酶:	takara
PrimerStar DNA 聚合酶:	takara
dNTPs:	北京化工厂
Ni-NTA agarose 树脂:	GE healthcare
DNAmarker	生工

1.2 主要仪器

表 2 实验主要仪器

仪器名称	型号	来源
大容量立式离心机	Backman	昆山市超声仪器有限公司
超声波细胞粉碎机	JY92-2D	宁波新芝公司
快速液相色谱仪	AKTA Pure	上海升利仪器测试有限公司
pH 计	JJ-1	北京易秀博谷生物科技有限公司
纯水仪	mili-Q	郑州长城科工贸有限公司
恒温培养箱	202-00	上海浦东荣丰科学仪器有限公司
电泳仪	DYY-6C	北京六一仪器厂
凝胶成像仪	TG 1650-WS	JY04S-3C Beijing Junyi-Dongfang Electrophoresis Equipment Co., itd.
摇床	TH2-C	苏州市英培实验设备有限公司
光学显微镜	IM6ex	ANTI-MOULD Nikon
PCR 扩增仪	AFMSRCE	东胜创新 PCR 仪
高压细胞破碎仪	JN3000 PLUS	JNBIO 公司
阳离子交换柱:	ZG-WT-028	
阴离子交换柱:	PRP-X110	GE Health Care
凝胶排阻层析柱	G-100	
核酸电泳仪	ST30-EPS-100	JY300E Beijing Junyi-Dongfang Electrophoresis Equipment Co., itd.

二、方法

本研究主要分为分子克隆、蛋白质表达纯化两个部分。在蛋白表达步骤，对比“冰浴降温”及“摇床降温”两种降温手段的降温速率，并探究两种降温手段导致杂蛋白 *arnA* 表达的差异。

1. 分子克隆

试验方法具体操作参考了《分子克隆实验指南第二版》^[8]，略有改动。

Nsp12 全长序列来源: NCBI^[9]

(1) PCR 聚合酶链式反应

选取 Nsp12 两端上下游 25bp 的序列, 分别加上 *Bam*HI 和 *Xho*II 酶切识别序列, 设计出正反向引物, 引物由金唯智生物科技有限公司合成。使用 pET-22b 载体作为表达载体、限制性内切酶切位点为 *Bam*HI 和 *Xho*II 进行 PCR 反应。得到带有可被特定的限制性核酸内切酶识别的粘性末端的 DNA 片段。

(2) 载体、片段的酶切及回收

通过琼脂糖凝胶电泳回收到的 PCR 产物的水溶液, 用 *Bam*HI 和 *Xho*II 限制性内切酶于 37°C 进行双酶切。

(3) 片段与载体的连接、转化, 阳性克隆的筛选、鉴定

将酶切后的载体与片段回收, 并以 1:5-1:10 摩尔比混合, 用 T4 连接酶 16°C 过夜连接, 将连接产物加入刚于冰上融化的 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 冰上静置 20 min。42°C 热激 45 s, 再置于冰上 3 min, 加入 300 μ L LB 培养基, 在 37°C 摇床培养 60 min。将感受态涂布于含有 100 mg/L 氨苄霉素的平板上, 于 37°C 过夜培养。

次日, 从平板上随机挑选多个单克隆, 分别接种于 5 mL LB 培养基中培养 10 h-15 h 后, 用质粒提取试剂盒提取质粒, 将少部分质粒进行酶切及琼脂糖凝胶电泳检测, 在相应基因大小位置有明显条带即初步判定为阳性克隆。阳性克隆对应质粒交由测序公司进一步进行测序。

2 蛋白表达纯化

根据构建成功的 pET-22b-Nsp12 表达质粒, 使用大肠杆菌原核表达系统表达并纯化出高质量的 SARS-CoV-2 Nsp12 蛋白。

(1) 蛋白表达:

大肠杆菌扩增培养、诱导: 将构建成功的 Nsp12 表达质粒转化入大肠杆

菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中，涂布于含有 100mg/L 氨苄青霉素的平板并于 37℃ 恒温箱过夜培养。从平板上挑取一个单克隆，接种于 5 mL 的 LB 培养基中，于 37℃ 摇床过夜培养。将 5 mL 的培养菌液接种到含 1L LB 培养基的锥形瓶中（氨苄青霉素浓度为 100 mg/L），37℃ 震荡培养 3-4 小时，至菌液的 OD 值在 0.6-0.8 之间，冰浴降温，加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.4 mM，并于 16℃ 过夜培养，诱导目的蛋白表达。

(2) 降温方式的探究：

大肠杆菌诱导之前需要降温至 16℃，一般采用冰浴的方式对培养瓶进行迅速降温。在尝试过改变诱导温度，诱导剂浓度等一系列条件，但无法提高蛋白质质量时，我尝试了使用摇床自带的降温系统对培养瓶进行缓慢降温，并对冰浴降温 and 摇床降温两种降温方式进行对比，探究两种降温手段导致杂蛋白 *arnA* 表达的差异。

① 平行设置两个实验组（互为对照）：24 瓶大肠杆菌菌液随机抽取 12 瓶采用冰浴降温，12 瓶采用摇床降温，均降低至 16℃。摇床降温条件：设置摇床温度 16℃，转速 180rpm，降温系数 0.5，冰浴降温条件：采用 2L 碎冰+2L 水，并将培养基放入。由于冰浴降温速度更快，故将冰浴降温组采样间隔设置为 1min，摇床组采样间隔 10min，至菌液温度达到 16℃ 时停止测量。

② 用冰浴降温 and 摇床降温得到的蛋白上清液均稀释至 200ml，每种上清液使用三根分别含有 5ml Ni 亲和介质（GE healthcare）的柱子进行纯化，通过重力使蛋白上清液流过柱底的介质，将上清液反复过柱三遍，洗去柱子中残余的上清液后，用 30ml 裂解缓冲液重悬介质，取样，待 30ml 洗杂裂解缓冲液流干后，再注入 30ml 裂解缓冲液，重悬并取样，以此类推，可分别得到 0ml、30ml、60ml、90ml 洗杂时的蛋白样品（裂解缓冲液成分：150mM NaCl, 25mM Tris 8.0, 4mM MgCl₂, 10% 甘油, 20mM 咪唑）。

③在洗杂 90ml 后，再继续用 60ml 裂解缓冲液对每柱亲和介质进行洗杂，使洗杂总体积达到 150ml，再用 30ml 裂解缓冲液对介质进行重悬，并再次取样。每管样品取 4 微升进行蛋白质凝胶电泳，检测洗杂效果，并使用 ImageJ 软件测算蛋白条带亮度，根据测量值计算杂蛋白占比。

(3) 纯化部分：

依照《蛋白纯化指南》第二版进行蛋白表达^[10]，略有改动。

①免疫亲和层析：将得到的含有目的蛋白的上清液加入含有镍填料的层析柱中，使用含有 20mM/L 咪唑的缓冲溶液进行杂蛋白的清洗，最后使用 200mM/L 咪唑的缓冲溶液竞争性地将目的蛋白洗脱下来。

②离子交换层析：根据 Nsp12 的带电性质使用阴离子交换柱进行结合，缓慢增加缓冲液盐浓度，根据 AKTA 系统对蛋白 280 特征吸收峰的监测，判断蛋白被洗脱的时间并进行收集。

③凝胶排阻层析：将离子交换纯化后的蛋白溶液浓缩并离心，上样至凝胶排阻柱中，达到分离不同分子量大小蛋白质的效果。

结果

1. 两种降温手段的降温速率的对比

不同降温手段对应的降温操作已在前文“降温方式探究”中详细描述。直到降温到 16℃ 停止采集数据时，两组各采集了 15 组数据，将数据导入到 graphpad 软件中进行做图，得到如下的瓶内培养基温度下降随时间变化的曲线（图 2），并根据数据计算出平均降温速率。

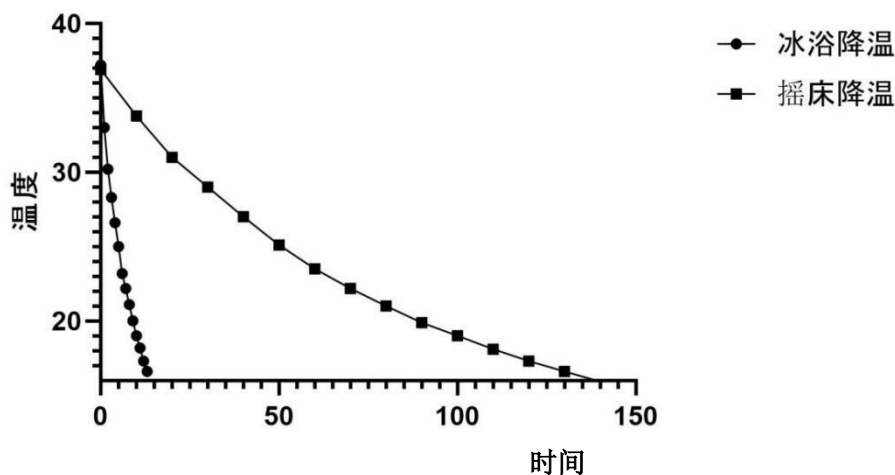


图 2. 两种降温方式的降温速率随时间变化曲线图

由图可以看出，如果将 1L 培养基从 37℃ 降至 16℃，冰浴降温需要 14 分钟，平均 1.5℃/min；摇床降温需要 140 分钟，平均 0.15℃/min，该实验可以证实，两种降温方式在降温速率上有较大差异。

2. 两种降温手段导致蛋白表达差异

探究不同降温手段对于杂蛋白影响的实验操作已在前文“降温方式探究”中详细描述。通过改变降温方式，原来的冰浴降温改变为摇床降温后，杂蛋白产生了明显的变化，首先是产量降低（图 3），其次是杂蛋白与目的蛋白的结合能力减弱（图 4-5）在未洗杂之前，杂蛋白的占比就由 55% 降低至 50%，用 90ml 缓冲液洗杂之后，杂蛋白降低至 19%，相比于冰浴降温实验组的 52% 有了明显的改善。

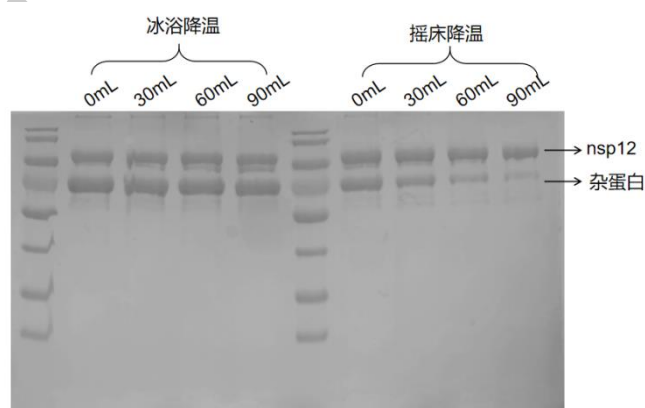


图 3. 两种降温方式在梯度洗杂后，柱中介质的蛋白凝胶电泳图

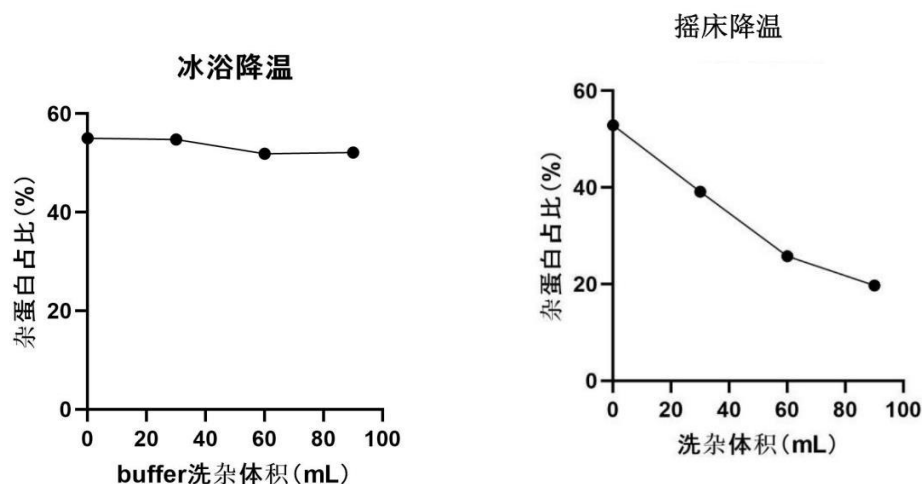


图 4-5 两种降温方式，梯度洗杂导致杂蛋白占比变化曲线图

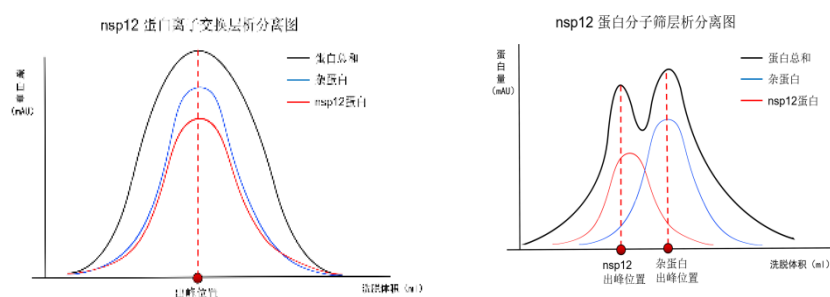
讨论

新冠肺炎疫情自 2019 年底首次在武汉爆发以来，迅速在世界范围扩散流行。对全人类产生了空前的影响，针对新型冠状病毒的药物靶点研究以及新药的研发迫在眉睫。2020 年 2 月 3 日，《自然》在线发表论文介绍了 SARS-COV-2 的基因组序列的分析^[11]。新冠病毒基因组由 29.9k bp 的碱基组成，有 14 个开放阅读框，其中开放阅读框 ORF1ab 共编码了 16 种非结构蛋白 nsp1 - nsp16。冠状病毒 16 种非结构蛋白主要在病毒的复制和转录过程中起重要作用，其中 Nsp12 是病毒转录复制复合物的核心蛋白，叫做 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA dependent RNA polymerase) 简称 RdRp，它负责 RNA 的合成，是病毒得以快速繁衍的关键，因此，也是最重要的抗病毒药靶之一。在冠状病毒家族中该蛋白较为保守，新冠病毒 Nsp12 与 SARS Nsp12 有着 96.4% 的序列相似度^[11]，目前 SARS 病毒的 Nsp12 结构已经被解析，新冠病毒 Nsp12 的结构解析值得尝试，因此，纯化出高质量的新冠病毒 Nsp12 蛋白对于该工作的推进有着重要的意义

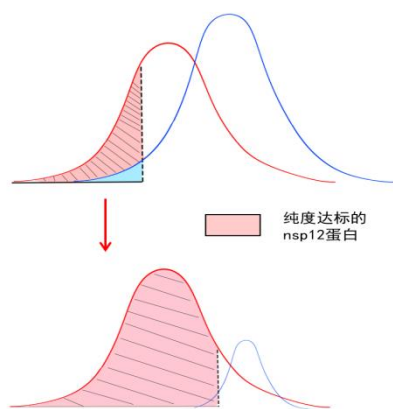
本研究致力于纯化高质量的新冠病毒 Nsp12 蛋白质，在研究过程中，发现杂蛋白 arnA 的存在极大影响了 Nsp12 的产量和纯度，因此后续的工作主要是围绕杂蛋白优化展开，通过对杂蛋白 arnA 的鉴定以及相关背景的调研，我们对于过量杂蛋白 arnA 的产生有利一个合理的猜想，也符合我们偶然一次实验更换降温条件而得到的效果，并以此设计了本实验，来探究更换降温手段对于蛋白纯

化的效果。通过实验证明，摇床降温的速率较慢，在较温和的降温条件下，杂蛋白 arnA 的表达量有所降低，并且与 Nsp12 的结合不再紧密，容易被缓冲液洗脱下来，该手段极大地提升了通过免疫亲和层析得到的蛋白的纯度，这使得后续的离子交换层析和分子筛层析的分离效果变得更好。

akta 蛋白纯化系统是通过不同的出峰位置来分离目的蛋白与杂蛋白，通过目的蛋白与杂蛋白的出峰示意图，可以说明纯化的难点以及优化后效果（图 6）。



A. 优化前 Nsp12 离子交换层析出峰示意图 B. 优化前 Nsp12 分子筛层析出峰示意图



C. 优化后杂蛋白减少后出峰位置不变但峰高降低，与目的蛋白混杂的部分大大减少，纯度足够、值得收集的 Nsp12 蛋白由优化前的一小部分变为优化后的绝大部分

图 6. 纯化原理示意图

在本研究中，改变降温方式对杂蛋白的产量和性质产生了影响，基于前期的调研我们进行如下推测，首先，急剧的降温会使得大肠杆菌细胞产生相应的应激反应，体现为表面由饱和的脂多糖变为不饱和脂多糖来保证细胞膜的流动性，而脂多糖的迅速更新需要大量 arnA 进行修饰，由此引发了 arnA 的过表达，这一进程中 arnA 的表达情况也可能和降温的幅度与剧烈程度有关系。此

外，关于 arnA 相关的结构研究表明，arnA 能够以四聚体和六聚体的形式存在，而在六聚体中其关键的羧化酶结构域紧密地朝向对称中心，不利于其行使催化功能^[12, 13]，因此猜测四聚体可能是行使其功能的基本单元，也是易于和 Nsp12 结合的状态，由于温度剧烈的变化，部分六聚体转变为四聚体进行催化以保护细胞，这也导致了其与 Nsp12 的紧密结合，因此，在使得温度变化缓和之后，大量与 Nsp12 松散结合的六聚体得以被轻易洗脱下来。基于上述猜想，后续我们可设计实验进行更多的探究和尝试，譬如构建 arnA 缺失型菌株，用于 Nsp12 蛋白的纯化；尝试体外表达 arnA 与 Nsp12，探究 arnA 不同聚集状态与 Nsp12 结合能力的差异等。

结论

通过一系列的尝试，我们通过利用摇床制冷系统进行缓慢的降温代替冰浴的快速降温优化了 Nsp12 的表达，减少杂蛋白的产生，纯化出了高质量的 Nsp12 蛋白质，保证了该蛋白在后续工作中的稳定产出，为结构解析、药物的筛选和酶活的测定奠定了良好的基础。

研究工作创新性

- 一、 新型冠状病毒横空出世席卷全球，该病毒的 Nsp12 蛋白承担着最核心的病毒复制的功能。专门对 Nsp12 的表达进行优化，从而得到足够的、高纯度的 Nsp12 蛋白，是开发抗新冠肺炎的特效药及药物的筛选的基础。经过查新，未见相似研究。值此疫情肆虐全球目前又无特效药之际，此研究尤显重要。
- 二、 我在进行表达条件优化的过程中发现：使用摇床制冷系统进行缓慢的降温代替冰浴快速降温，能够显著减少杂蛋白的产生和对目的蛋白的附着，大幅提高了目的蛋白的纯度和表达量，从而降低了后续纯化步骤的难度，为今后蛋白表达条件的优化提供了一个新的策略。

参考文献

1. Matheson, N. J. and P. J. Lehner, How does SARS-CoV-2 cause SARS-CoV-2? *Science*, 2020. 369(6503): 510-511.
2. Xiang Xu, Yunqing Liu, Susan Weiss et al, Molecular model of SARS coronavirus polymerase: implications for biochemical functions and drug design. *Nucleic Acids Res.* 2003 Dec 15;31(24):7117-30
3. Elfiky, A. A., Corrigendum to "Ribavirin, Remdesivir, Sofosbuvir, Galidesivir, and Tenofovir against SARSCoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp): A molecular docking study" *Life Sci*, 2020. Oct 1;258:118350.
4. Yan Gao, Liming Yan, Yucen Huang et al, Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 virus. *Science*, 2020: 368(6492):779-782
5. Steimle A, Autenrieth IB, Frick JS, Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens, *Int J Med Microbiol*, 2016 Aug;306(5):290-301.
6. Yamanaka K. Cold shock response in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 1999 Nov;1(2):193-202.
7. Charles R Sweet, Giancarlo M Alpuche, Corinne A Landis et al, Endotoxin structures in the psychrophiles *Psychromonas marina* and *Psychrobacter cryohalolentis* contain distinctive acyl features. *Mar Drugs*, 2014 Jul 9;12(7):4126-47
8. 萨姆布鲁克 E·F·弗 《分子克隆实验指南第二版》，科学出版社，ISBN: 9787030028082
9. Quan Wang, Jiqin Wu, Haofeng Wan et al, Structural Basis for RNA Replication by the SARS-CoV-2 Polymerase, *Cell*, 2020 Jul 23;182(2):417-428
10. R. R. 伯吉斯 《蛋白纯化指南第二版》，科学出版社，ISBN: 978703038095
11. Romano M, Ruggiero A, Squeglia F et al, A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. *Cells.* 2020 May 20;9(5):1267.
12. Gatzeva-Topalova PZ, May AP, Sousa MC. Structure and mechanism of ArnA: conformational change implies ordered dehydrogenase mechanism in key enzyme for polymyxin resistance. *Structure* 2005 Jun;13(6):929-42.

13. Fischer, Utz, Grimm, et al. The structure of apo ArnA features an unexpected central binding pocket and provides an explanation for enzymatic cooperativity.

Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2015 Mar;71(Pt 3):687-96.

2021 S.-T. Yau High School Science Award

致谢

新型冠状病毒肺炎疫情在全球流行，对世界产生了空前的影响。疫情发生后，清华大学饶子和院士团队在长期、潜心开展冠状病毒研究的基础上，迅速开展针对新型冠状病毒的研究，而此时我恰逢“青少年科技后备人才培养计划”的选题阶段，有感于此项研究的社会价值及现实意义，我决定将新冠病毒作为自己的课题研究方向。

本次课题研究，从选题、教授培养、实验研究、数据整理分析直到论文完成，一共历时将近二十一个月。这段时间不只是课题研究时间，也是我在北京市科协的青少年科技后备人才培养的过程。

感谢我的导师清华大学的饶子和教授无偿为我进行选题指导；感谢李明宇博士无偿为我进行理论、实验及论文书写指导，感谢实验室专家团队的每一位老师为我提供一个了解科学，接近科学的平台，使我懂得了只有具备严谨治学、刻苦认真的研究态度才能够成为一个科学人才的道理。

感谢北京师范大学附属实验中学生物特级教师李晓辉老师无偿为我进行理论指导、答疑解惑；方伟老师无偿为我进行英语论文指导，他们给予我耐心的教导，使当时尚未真正接触过病毒的我由不懂到入门，并且有了今天的一点小小成绩。

感谢一直支持和教诲我的父母和那些热心为我讲解知识的其他学者、老师，以及在活动中曾经帮助过我的同学们。谢谢大家！

丘成桐中学科学奖-学术诚信声明

本参赛团队郑重声明：

1. 参赛团队提交的参赛队员和指导老师信息完整且属实无误。
2. 所提交的研究报告是在指导老师指导下进行的研究工作和取得的研究成果。
3. 尽本团队所知，除文中加以标注和致谢中所罗列的内容外，研究中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不存在代写或其他违规行为。

以上，若有不实之处，本人愿意承担一切相关责任，并服从丘成桐中学科学奖组织委员会的裁决。

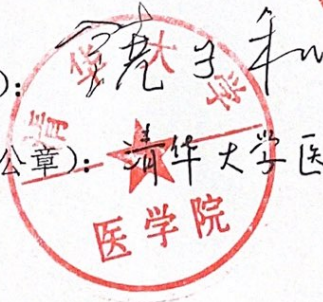
参赛学生（签字）：刘奕飞

本校指导老师（签字）：李雪峰

学校名称（加盖学校或教务处公章）：北京清华大学附属实验中学

外校指导老师（签字）：李雪峰

单位名称（加盖单位公章）：清华大学医学院



2021年9月13日