

研究报告

我国诺如病毒易重组基因型 GII.P12/GII.3 毒株 RNA 聚合酶的表达与功能表征

蔡淑珍[#], 高珺珊[#], 薛亮^{*}, 程彤, 王林平, 梁燕惠, 张菊梅, 吴清平^{*}

广东省科学院微生物研究所 华南应用微生物国家重点实验室 广东省微生物安全与健康重点实验室 农业农村部农业微生物组学与精准应用重点实验室, 广东 广州 510070

蔡淑珍, 高珺珊, 薛亮, 程彤, 王林平, 梁燕惠, 张菊梅, 吴清平. 我国诺如病毒易重组基因型 GII.P12/GII.3 毒株 RNA 聚合酶的表达与功能表征[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 964-974

Cai Shuzhen, Gao Junshan, Xue Liang, Cheng Tong, Wang Linping, Liang Yanhui, Zhang Jumei, Wu Qingping. Expression and characterization of RNA polymerase of the norovirus recombinant GII.P12/GII.3 strain isolated in China[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 964-974

摘要:【背景】诺如病毒是引起人类急性胃肠炎的主要食源性病原体。目前尚无获批的诺如病毒疫苗和药物, 诺如病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RdRp)是当前抗诺如病毒药物开发的主要靶点。

【目的】表达我国诺如病毒易重组基因型 GII.P12/GII.3 毒株的 RdRp 并系统地表征其复制特征。

【方法】基于大肠杆菌系统表达并纯化得到高纯度可溶性的 GII.P12/GII.3 诺如病毒 RdRp 蛋白, 通过体外 RNA 合成实验确定温度、模板、底物和盐浓度对 RdRp 功能的影响。【结果】GII.P12/GII.3 诺如病毒的 RdRp 在 30 °C、1 mmol/L 氯化锰条件下酶活性最佳。酶动力学实验表明底物 GTP 和模板 polyC 的 K_m 值分别为 79.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 10.6 $\mu\text{g/mL}$ 。体外抑制试验表明, RdRp 在微摩尔范围内可被利巴韦林、法维拉韦和 NF023 有效抑制, 半数最大抑制浓度分别为 23、59 和 11 $\mu\text{mol/L}$ 。

【结论】首次表征了诺如病毒易重组基因型 GII.P12/GII.3 毒株 RdRp 的酶学特性。基于荧光的酶活性测试表明, RdRp 在体外具有催化活性, 这为诺如病毒 RdRp 抑制剂的筛选及诺如病毒感染的治疗提供了良好的技术和理论支持。

关键词: 诺如病毒; RNA 依赖性 RNA 聚合酶; GII.P12/GII.3; 抑制剂

基金项目: 国家自然科学基金(31872912); 广东省自然科学基金杰出青年基金(2019B151502065); 广东省重点领域研发计划(2019B020209001); 江西省重点领域研发计划(20202BBGL73053)

[#]对本文贡献相同

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31872912); Natural Science Foundation of Guangdong Province for Distinguished Young Scholars (2019B151502065); Key Research and Development Program of Guangdong Province (2019B020209001); Key Research and Development Program of Jiangxi Province (20202BBGL73053)

[#]These authors equally contributed to this work

***Corresponding authors:** E-mail: XUE Liang: xueliang@gdim.cn; WU Qingping: wuqp203@163.com

Received: 2021-10-09; **Accepted:** 2021-11-08; **Published online:** 2021-12-21

Expression and characterization of RNA polymerase of the norovirus recombinant GII.P12/GII.3 strain isolated in China

CAI Shuzhen[#], GAO Junshan[#], XUE Liang^{*}, CHENG Tong, WANG Linping, LIANG Yanhui, ZHANG Jumei, WU Qingping^{*}

Key Laboratory of Agricultural Microbiomics and Precision Application, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China

Abstract: [Background] Norovirus is the primary foodborne pathogen causing acute gastroenteritis in humans. There are currently no licensed vaccines and drugs available for this virus. RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of norovirus is a major target for the development of antivirals. [Objective] This study intended to express the RdRp of norovirus recombinant GII.P12/GII.3 and systematically study its replication characteristics. [Methods] The high-purity soluble RdRp of GII.P12/GII.3 was expressed and purified in *Escherichia coli*. The effects of temperature, template, substrate, and salt concentration on the function of RdRp were determined by *in vitro* RNA synthesis experiments. [Results] The RdRp of GII.P12/GII.3 showed the highest activity at 30 °C and 1 mmol/L MnCl₂. The K_m values of RdRp binding substrate GTP and template polyC were 79.0 μmol/L and 10.6 μg/mL, respectively. *In vitro* inhibitory assays indicated that ribavirin, favipiravir, and NF023 in the micromolar range inhibited RdRp, with half-maximal inhibitory concentrations of 23 μmol/L, 59 μmol/L, and 11 μmol/L, respectively. [Conclusion] This study firstly reported the RdRp properties of norovirus recombinant genotype GII.P12/GII.3. Fluorescence-based enzyme activity tests showed that RdRp had catalytic activity *in vitro*, which provided technical and theoretical support for the screening of norovirus RdRp inhibitors and the treatment of norovirus infections.

Keywords: norovirus; RNA-dependent RNA polymerase; GII.P12/GII.3; inhibitors

诺如病毒是引起散发性腹泻和急性非细菌性胃肠炎的主要病原体,对人类健康构成严重威胁^[1]。诺如病毒可感染所有年龄段的人群,但对老年人、幼儿和免疫功能低下者(如移植受者)的感染更为严重,甚至危及生命^[2-4],具有高发病率和死亡率。中国是诺如病毒流行的主要地区之一^[5]。诺如病毒复制和抗病毒研究的主要障碍是缺乏通用高效的细胞培养系统和诺如病毒感染小动物模型。截至目前尚无临床批准的疫苗或特定治疗药物可用于预防或治疗诺如病毒感染^[6-7],临床疗法仅限于补充电解质^[8]。

诺如病毒为杯状病毒科诺如病毒属,由一个长约 7.5–7.7 kb 的单链 RNA 基因组组成,其中包含 3 个开放阅读框(open reading frame, ORF)^[9]。ORF1 编码一个大的多聚前体蛋白,该前体被加工成 6 种参与病毒复制的非结构蛋白^[10]。诺如病毒 RNA 聚合酶(RdRp)位于 ORF1,是参与病毒基因组转录和复制的关键酶^[11]。由于重组的广泛存在, RdRp 也被用于基因分型和命名。基于诺如病毒衣壳蛋白和 RdRp 的双分型系统,诺如病毒被分为 10 个(GI–GX)基因组和 48 个基因型和 60 种 P 型^[12]。在过去的 20 年中,诺如病毒

GII.4 基因型为主要流行基因型^[13]。但近年来诺如病毒流行的形势发生了变化,具有不同聚合酶和衣壳基因型的重组病毒的出现和流行被普遍报道,如 GII.P16/GII.4^[14]和 GII.P16/GII.2^[15],体现了获得新的 RdRp 基因在诺如病毒进化和流行中的重要作用。

诺如病毒 RdRp 结构和功能的解析有助于了解病毒复制和致病机制,并可以指导有效抗病毒药物的开发。目前已被证明对诺如病毒 RdRp 具有潜在抑制作用的化合物主要分为两类:核苷类似物(利巴韦林、法维拉韦^[16]、2-C-甲基胞苷^[17])和非核苷抑制剂^[18](苏拉明、NF023、NIC02 和 NIC04^[19])。核苷类似物的作用机制是通过与病毒 RNA 聚合酶的活性位点竞争性结合来阻止病毒复制。聚合酶活性位点的高度保守性使核苷类似物抑制剂具有广谱的特性。尽管针对诺如病毒 RdRp 的抗病毒疗法研究很多,但目前尚无临床批准的抗诺如病毒小分子抑制剂,其中一些处于临床前和临床评估的早期阶段^[4,16,19-23],因此仍然迫切需要开发诺如病毒的抗病毒药物。

GII.3 型是诺如病毒常见基因型之一,衣壳蛋白和 RdRp 基因之间的基因间重组推动了 GII.3 型诺如病毒的进化,增强了遗传多样性和适应性^[24]。GII.P12 是诺如病毒腹泻病例中经常检测到的重组基因型,并且极易与 GII.3 型的衣壳蛋白基因发生重组。在本团队之前的诺如病毒监测中,我国广州地区曾检测到 GII.P12/GII.3^[25],其他地区也有该基因型的报道^[14,26-27],有时其甚至作为优势基因型被检出。重组已被发现是诺如病毒进化的重要方式,关于 RdRp 复制特性的研究也日益受到关注。其中 GII.P12/GII.3 重组型是目前导致散发性腹泻的常见基因型之一,然而目前仍尚未见重组 GII.P12/GII.3 RdRp 酶特性的相关报道。因此,本研究表达了广州 GII.P12/

GII.3 诺如病毒株的聚合酶,对其酶活性进行表征并对其抑制剂进行筛选,以期了解重组 GII.P12/GII.3 的 RdRp 酶生化特性及分子机制。

1 材料与方法

1.1 诺如病毒毒株

重组 GII.P12/GII.3 诺如病毒株来源于编号为 GZ2013-L20 (Hu/Guangzhou/GZ2013-L20/CHN/2013)的临床粪便样本, GenBank 登录号为 KY348697^[25,28]。

1.2 主要试剂和仪器

PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、PrimeSTAR Max DNA Polymerase 和限制性内切酶(*Bam*H I、*Not* I), 宝生物工程有限公司; 单链 RNA 模板 polyC, Sigma 有限公司; 底物 GTP、双链 RNA 荧光染料 PicoGreen Quantitation Reagent, 广州昂科生物科技有限公司。多功能酶标仪, 上海帝肯有限公司; AKTA 层析纯化仪, GE Healthcare。

1.3 多序列比对和系统发育分析

从 NCBI GenBank 数据库下载所有诺如病毒全长 GII.P12 聚合酶基因序列, 包括本研究使用的 GII.P12/GII.3 诺如病毒株。使用 MEGA 7.0.21 软件对它们进行比对, 采用最大似然法构建系统发育树。

1.4 表达载体的构建

GII.P12/GII.3 诺如病毒阳性粪便样本用焦碳酸二乙酯(DEPC)处理过的水稀释成 10%的悬浮液, 并使用病毒总 RNA 提取试剂盒从粪便悬浮液中提取病毒总 RNA。使用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 合成与诺如病毒 GII.P12/GII.3 编码序列互补的全长 cDNA。根据 GII.P12/GII.3 型 RdRp 区域设计扩增引物, 上、下游引物分别引入 *Bam*H I、*Not* I 酶切位点(表 1), 通过 PCR 从诺如病毒全长 cDNA 中扩

表 1 用于构建表达载体的引物序列

Table 1 Primer sequences for construction of expression vectors

引物名称	引物序列	酶切位点
Primer name	Primer sequence (5'→3')	Restriction site
GII.P12/GII.3 Forward	CG GGATC CGGTGGTGACAATAAAGGA	<i>Bam</i> H I
GII.P12/GII.3 Reverse	ATTT GCGCCG CTTCGACGCCATCTTCA	<i>Not</i> I

注: 加粗部分为限制性酶切位点, 下划线部分为内切酶的识别位点

Note: The bold part is the restriction enzyme site, the underlined is the recognition site of the incision enzyme.

增 RdRp 编码区。使用带有 GST 标签的 pGEX-4T-1 表达载体构建 RdRp 原核表达质粒。用 QuickCut *Bam*H I 和 *Not* I 限制酶双酶切 pGEX-4T-1 表达载体及扩增产物。使用 DNA Ligation Mix 试剂盒将 RdRp 片段连接到线性化载体中。

1.5 GII.P12/GII.3 RdRp 的表达和纯化

将 1.4 中的重组质粒转化到大肠杆菌 BL21 感受态细胞中, 涂板后进行菌落 PCR 及测序验证。选择阳性菌落扩大培养后诱导表达, 收集大肠杆菌重悬于 PBS 中并进行高压破碎。10 000×g 离心 15 min 取上清, 使用 0.22 μm 滤膜过滤上清液, 使用 AKTA 系统纯化 GST-RdRp 融合蛋白。将纯化的 GST-RdRp 通过凝血酶(thrombin) 22 °C 处理 16 h 切掉 GST 标签。利用 SDS-PAGE 电泳对纯化的 RdRp 蛋白进行确认。使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定纯化的 RdRp 蛋白浓度, 分装保存于-80 °C 冰箱。

1.6 RdRp 活性测定

利用从头 RNA 合成方法测定 GII.P12/GII.3 RdRp 的酶活性^[19]。将 dsRNA 荧光染料 PicoGreen 添加到反应混合物中量化 RdRp 活性, 该染料与 dsRNA 特异性结合^[29]。反应的总体积为 25 μL, 包含 40 μg/mL polyC、0.5 mmol/L GTP、2.5 mmol/L MnCl₂、5 mmol/L 无 RNase 的二硫苏糖醇(DTT)、20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 和 2 μg/mL RdRp。反应在 30 °C 下孵育 1 h, 之后将反应混合物转移到黑色 96 孔板中, 加入用 pH 7.5 TE 缓冲液稀释(1:200, 体积比)的 175 μL

荧光染料至终体积 200 μL。在黑暗条件下室温孵育 5 min 后, 使用多功能酶标仪测量荧光强度(激发波长和发射波长分别为 485 nm 和 520 nm)^[30]。每个测试样品的相对荧光值为测量值减去空白对照(未添加 RdRp)后的平均荧光值。

通过改变二价盐浓度(0-10 mmol/L)、底物 GTP 浓度(0-2.0 mmol/L)、模板 polyC 浓度(0-100 μg/mL)、RdRp 的加入量(0-5 μg/mL)和反应温度(4-60 °C), 确定最佳 RdRp 活性的条件。在 GraphPad Prism V8.0.1 软件中通过非线性回归分析绘制反应速度与底物和模板浓度的关系, 确定反应的具体动力学参数。

1.7 体外 RdRp 抑制试验

测试了 2 种核苷类似物利巴韦林和法维拉韦以及一种非核苷类似物苏拉明的类似物 NF023, 以评估它们对体外 RdRp 活性的影响。RdRp 抑制试验在含有 25 μL 反应混合物和 65 μL 稀释荧光染料 PicoGreen 的黑色 96 孔板中进行^[19]。体外抑制实验的标准反应体系包含 1 μg/mL RdRp、20 μg/mL polyC、0.05 mmol/L GTP、5 mmol/L DTT、1 mmol/L MnCl₂、20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)和不同浓度的上述测试化合物。在开始反应之前, 将 1 μg RdRp 与适当浓度的测试化合物在 30 °C 下孵育 10 min, 使酶和抑制剂相互作用, 同时做空白对照(不加抑制剂)。再将反应混合物添加到预孵育的 RdRp 与抑制化合物中, 并在 30 °C 下反应 1 h, 然后使用酶标仪(激发波长和发射波长分别为 485 nm 和 520 nm)测定荧光强度。使用 GraphPad Prism 软

件进行非线性回归分析以确定不同抑制剂的半数最大抑制浓度(IC_{50})。

2 结果与分析

2.1 基于诺如病毒 GII.P12 RdRp 序列的系统发育分析

GII.P12 诺如病毒的 RdRp 基因全长 1 530 bp, 编码 510 个氨基酸。将其与其他不同基因型的诺

如病毒 RdRp 序列进行比对, 构建系统发育树。结果表明, RdRp 是 NoV 基因组中的保守区域, 两两比对相似度为 94.6%, 其中保守位点占 78.6%。所有序列可以分为 5 个簇, 其对应的衣壳蛋白 VP1 分型分别包括 GII.3、GII.4、GII.13、GII.10 和 GII.12 (图 1)。其中本文 GII.P12/GII.3 毒株 RdRp 基因与 GII.P12/GII.13 和 GII.P12/GII.2 的平均相似度最低(分别为 90.3%和 90.2%),

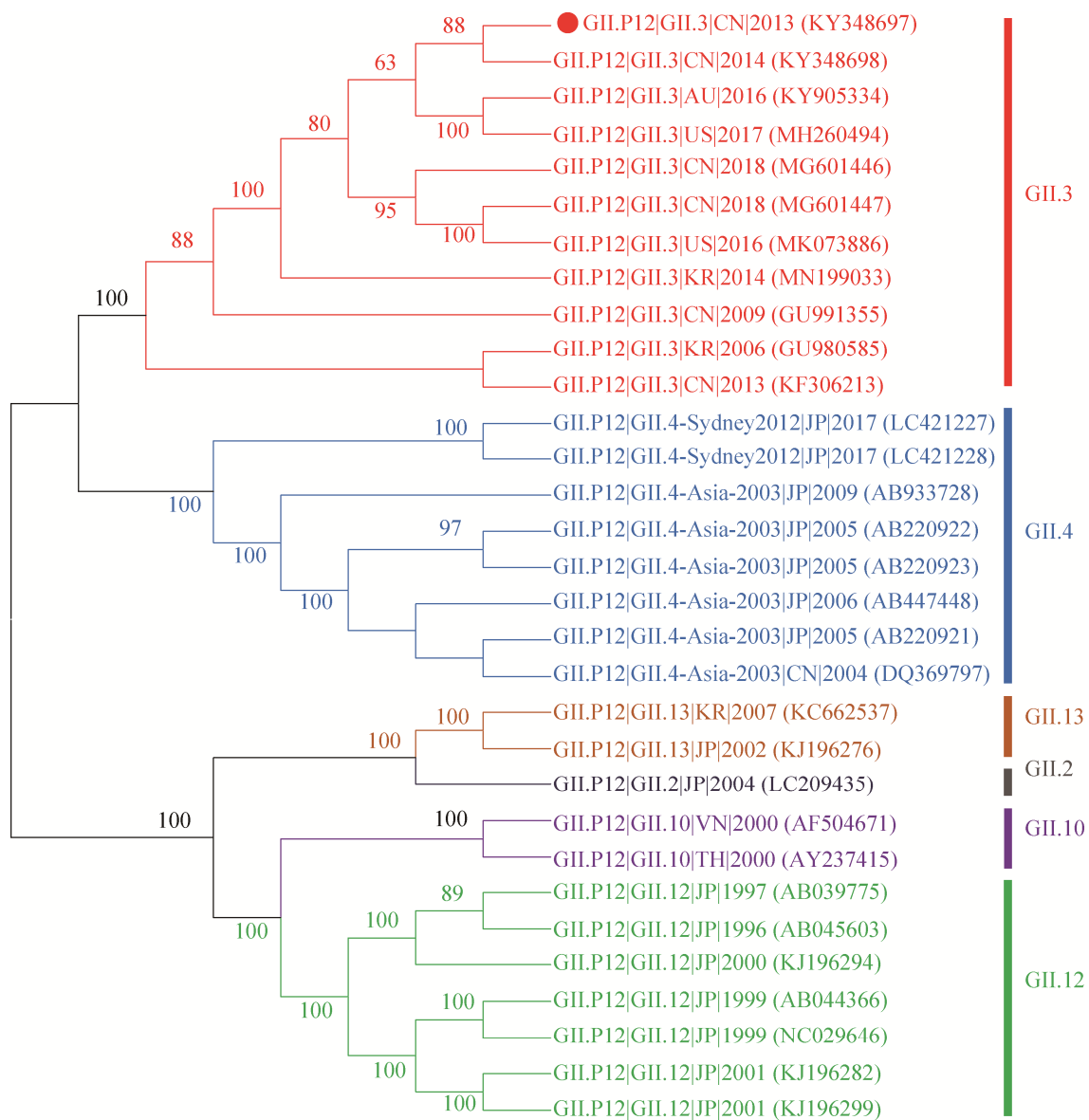


图 1 GII.P12 重组诺如病毒株的系统发育分析

Figure 1 Phylogenetic analysis of GII.P12 recombinant norovirus strains.

而与 GII.P12/GII.4 之间的亲缘关系较近(平均相似度为 96.1%)。

2.2 GII.P12/GII.3 RdRp 的表达和纯化

利用原核表达系统每 0.25 L 细菌培养物可获得大约 1–2 mg 的 GST-RdRp 蛋白。大部分 GST-RdRp 蛋白以可溶性形式存在于细菌裂解物的上清液中(图 2A), 大小约为 80 kDa。经 GST 柱纯化洗脱液中得到目标大小蛋白(图 2B)。通过凝血酶水解去除 GST 标签后, 使用 GST 柱进一步纯化 RdRp, 获得了预期分子量约为 57 kDa 的 RdRp 蛋白(图 2C)。

2.3 GII.P12/GII.3 诺如病毒聚合酶活性的表征

为了评估 GII.P12/GII.3 RdRp 的催化活性, 进行了依赖于 polyC 的体外 RNA 合成分析。首先评估酶浓度对 RdRp 活性的影响。当无 RdRp 时未检测到荧光信号, 而加入 RdRp 蛋白组,

dsRNA 的合成与 0–3 $\mu\text{g/mL}$ 的酶浓度呈线性关系, 随着酶浓度的增加(0–3 $\mu\text{g/mL}$)荧光信号逐渐增加, 表明 RdRp 可以催化 dsRNA 的形成, 纯化获得的 RdRp 蛋白是有活性的(图 3A)。在高酶浓度下活性不再增加, 可能是由于缺乏足够的底物。热灭活组在不同浓度的 RdRp 下无明显荧光(图 3A)。当使用 1 $\mu\text{g/mL}$ RdRp 时, 荧光强度在 120 min 内呈线性累积(图 3B)。

为了确定 RdRp 活性的最佳反应条件, 测定了影响 GII.P12/GII.3 RdRp 活性的各项因素。使用 0–10 mmol/L MgCl_2 和 MnCl_2 确定二价盐浓度对 RdRp 活性的影响。在不同浓度的 Mg^{2+} 存在下未检测到 RdRp 活性(图 3C)。在 MnCl_2 浓度为 1 mmol/L 时表现出最佳活性。这些结果表明 RdRp 的活性完全取决于 Mn^{2+} 离子的存在。在 4–60 $^{\circ}\text{C}$ 的范围内比较 RdRp 催化活性, 结果表明 RdRp 催化形成 dsRNA 的最佳反应温度

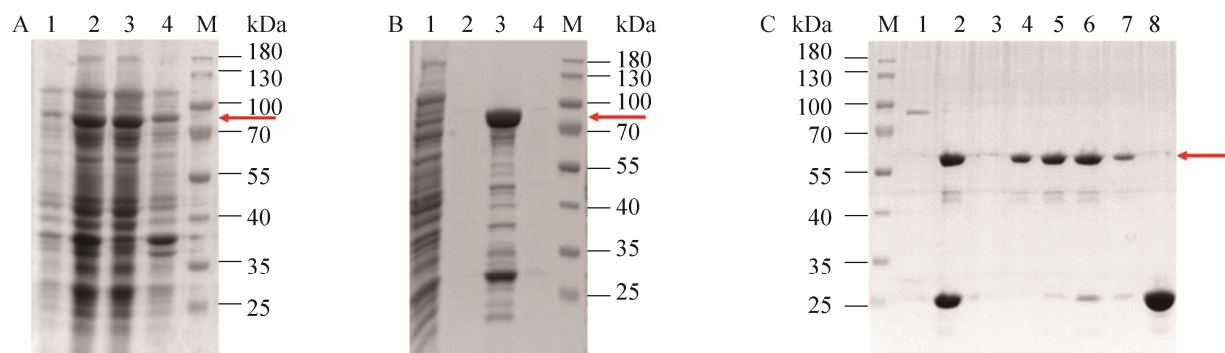


图 2 GII.P12/GII.3 RdRp 在纯化过程不同阶段的 SDS-PAGE 电泳分析 A: 诺如病毒 RdRp 在大肠杆菌中的表达, 1: 未用 IPTG 诱导的总菌裂解液; 2: IPTG 诱导后的总菌裂解液; 3: 菌体裂解的上清液; 4: 菌体裂解沉淀。B: GST-RdRp 的纯化, 1: GST 柱流穿液; 2、4: GST 柱清洗液; 3: 纯化的 RdRp 融合蛋白。C: 凝血酶去除重组 RdRp 的 GST 标签, 1: 未经凝血酶处理的纯化的 GST-RdRp; 2: 凝血酶处理后的 GST-RdRp; 3–7: 酶切后 GST 纯化柱纯化的 RdRp; 8: 洗脱的 GST 标签。A、B 中红色箭头为 GST-RdRp 位置, C 中红色箭头为 RdRp 位置

Figure 2 SDS-PAGE analysis of GII.P12/GII.3 recombinant RdRp at different stages of the purification process. A: Expression of norovirus RdRp in *E. coli*; 1: Total cell lysate without induction with IPTG; 2: Total cell lysate after induction with IPTG; 3: The supernatant of the cell lysates; 4: The pellet of the cell lysates. B: Purification of GST-RdRp; 1: GST column flow-through fraction; 2, 4: GST column elution fraction; 3: Purified RdRp fusion protein. C: Recombinant RdRp was treated with thrombin for removal of the GST tag; 1: SDS-PAGE of purified GST-RdRp without thrombin treatment; 2: GST-RdRp digested by thrombin; 3–7: RdRp purified by GST column after digestion; 8: GST tag eluted from the GST column. GST-RdRp (A, B) and RdRp (C) of the correct size is marked with a solid red arrow.

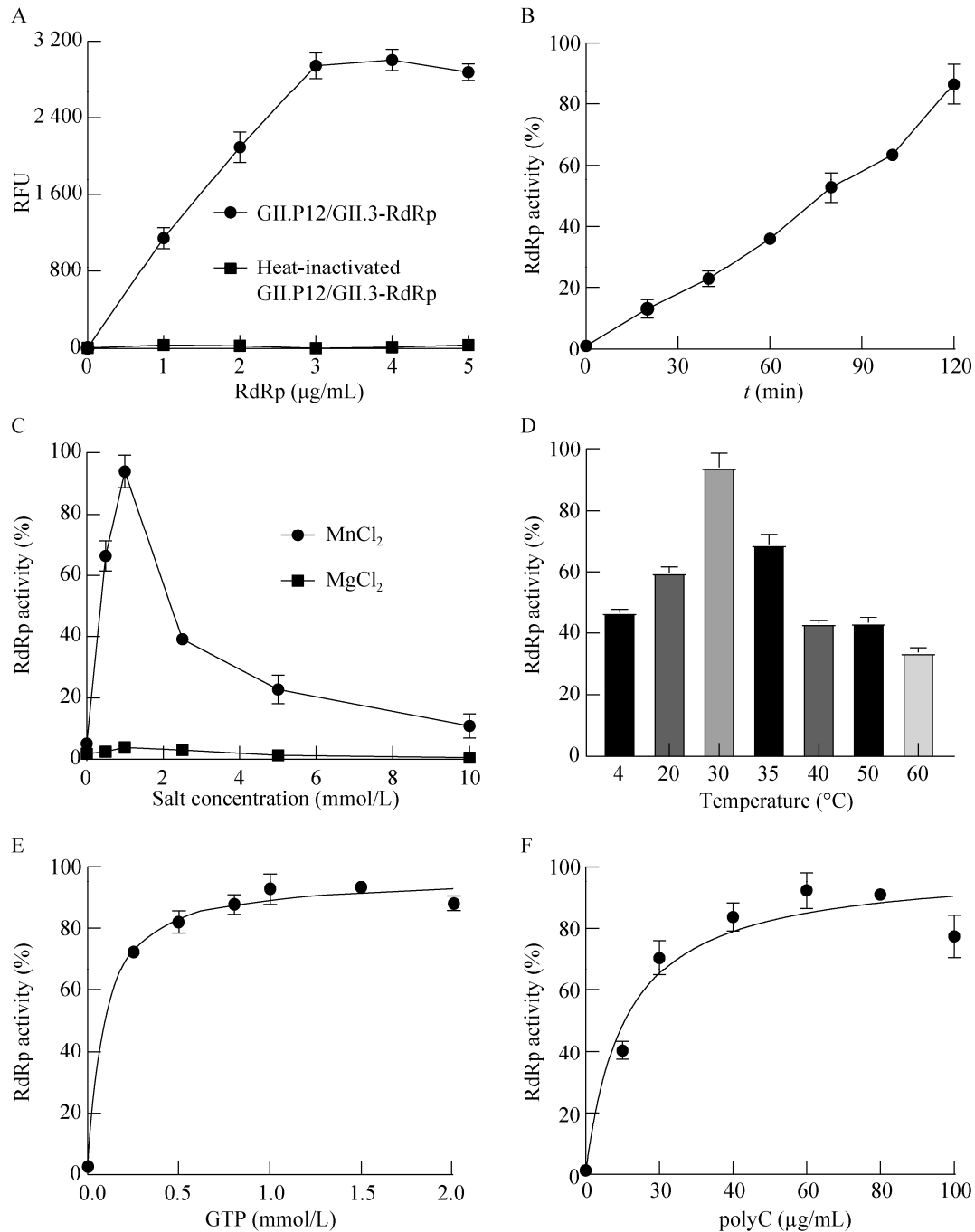


图3 影响 GII.P12/GII.3 诺如病毒 RdRp 活性的生化因素的特征 A: 1 h 内酶浓度对 RdRp 活性的影响; B: 1 $\mu\text{g/mL}$ RdRp 在 2 h 内催化合成 dsRNA 的活性情况; C: 盐浓度对 RdRp 催化活性的影响; D: 温度对 RdRp 活性的影响; E: 底物浓度对 GII.P12/GII.3 RdRp 活性的影响; F: 模板浓度对 GII.P12/GII.3 RdRp 活性的影响

Figure 3 Characterization of biochemical factors influencing the activity of GII.P12/GII.3 norovirus RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). A: Effect of enzyme concentration on *de novo* RdRp activity over 1 h; B: Synthesis of dsRNA catalyzed by 1 $\mu\text{g/mL}$ RdRp over 2 h; C: The effects of salt concentration on the catalytic activity of RdRp; D: The effects of temperature on RdRp activity; E: The effects of substrate concentration on RdRp activity; F: The effects of template concentration on RdRp activity.

为 30 °C (图 3D)。当孵育温度高于 40°C 时, RdRp 的催化活性显著降低。在低底物浓度 (0–0.5 mmol/L) 情况下, RdRp 活性显著增加, 底物浓度高于 0.5 mmol/L (0.5–2.0 mmol/L) 时, 酶促反应速率稳定, 不再增加 (图 3E)。RdRp 活性随着 polyC 浓度的增加而增加, 并逐渐达到平台期 (图 3F)。对底物及模板的利用率均符合 Michaelis-Menten 模型, 底物 GTP 的 K_m 值为 79.0 $\mu\text{mol/L}$ 。模板 polyC 的 K_m 值为 10.6 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4 RdRp 抑制剂的测试

基于荧光的体外 RdRp 活性测定用于鉴定 RdRp 聚合酶抑制剂作用效果。分别评估了核苷和非核苷抑制剂对 GII.P12/GII.3 RdRp 活性的影响。体外抑制试验表明, RdRp 的从头合成活性在微摩尔范围内可以被利巴韦林、法维拉韦和 NF023 有效抑制, 半数最大抑制浓度分别为 23、59 和 11 $\mu\text{mol/L}$ (图 4A–4C)。与法维拉韦和利巴韦林相比, NF023 对 RdRp 表现出更强的抑制作用 (图 4D)。

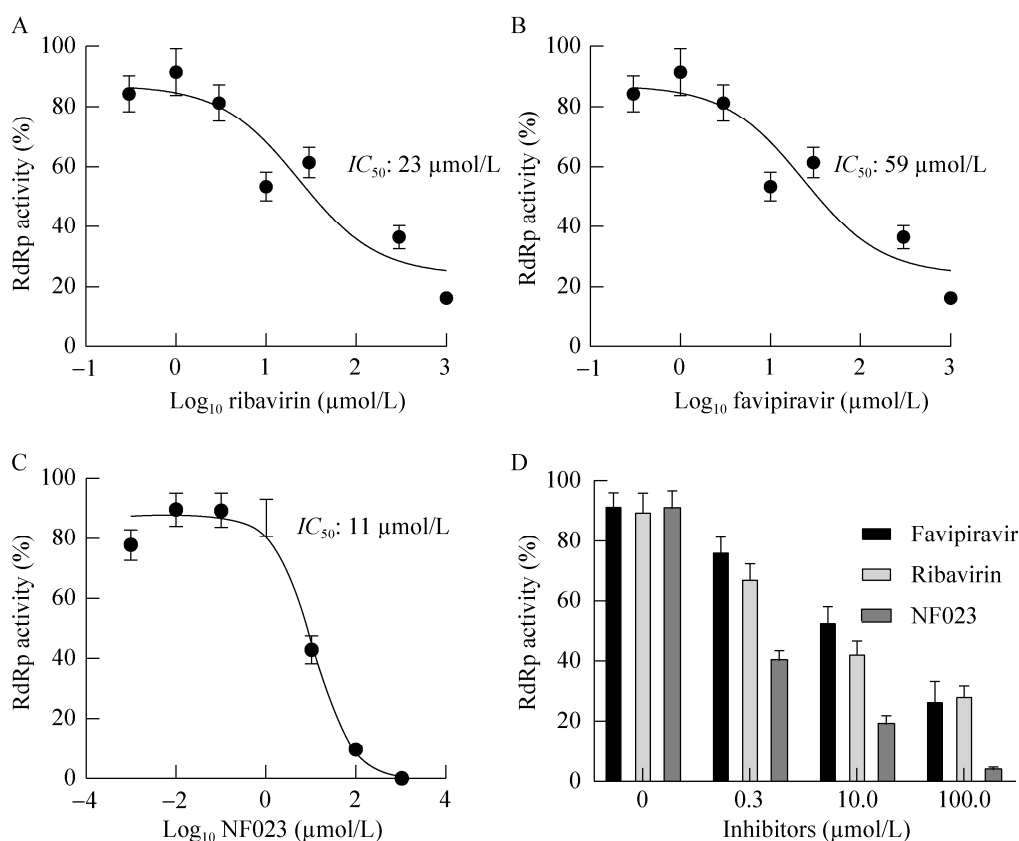


图 4 核苷和非核苷类似物抑制剂对诺如病毒 GII.P12/GII.3 聚合酶活性的影响 A、B、C: 不同浓度的利巴韦林(A)、法维拉韦(B)及 NF023 (C)对 GII.P12/GII.3 RdRp 从头活性的影响; D: 利巴韦林、法维拉韦和 NF023 对 RdRp 的抑制作用比较

Figure 4 Inhibition of norovirus GII.P12/GII.3 polymerase activity by selected nucleoside and nonnucleoside analogs. A, B, C: The effects of ribavirin (A), favipiravir (B), and NF023 (C) at different concentrations on the *de novo* activity of GII.P12/GII.3 RdRp; D: Comparison of the inhibition effects of ribavirin, favipiravir, and NF023.

3 讨论与结论

GII.P12 和 GII.3 是 2 种分别基于 RdRp 分型和 VP1 分型的常见诺如病毒基因型, 在流行病学监测中被确定为重组株。与大流行的 GII.4 型毒株相比, GII.3 型诺如病毒重组株是散发性胃肠炎和儿童腹泻的主要病因。自 2010 年以来, 大多数 GII.3 重组株被鉴定为 GII.P12/GII.3 和 GII.P21/GII.3 这 2 种重组类型^[25]。本研究针对易发生重组的诺如病毒基因型开展研究, 首次系统地表征了 GII.P12/GII.3 型 RdRp 的生化特性, 并筛选评价了常见抑制剂的作用效果。

RNA 聚合酶的研究日益受到重视^[31], 尤其基于聚合酶结构筛选病毒抑制剂成为热点^[32-33]。近年来, GII.P4、GII.P7、GII.P21 等型别 RdRp 的复制特性均陆续被报道^[30,34-35], 我国学者也成功获得了 GII.P16 型 RdRp 的重组蛋白晶体^[36]。目前诺如病毒 RdRp 的制备均主要采用原核表达体系, 有研究发现原核表达体系获得的 RdRp 若带有组氨酸标签将会导致酶活性丢失^[37-38], 但将标签切除后的带有 GST 伴体表达融合蛋白则仍具有体外催化活性^[35]。本研究选择 pGEX-4T-1 表达载体, 纯化后将 GST-RdRp 标签切除。此外, 原核表达体系与真核表达体系在蛋白的翻译后修饰等加工机制上存在不同, 然而目前该方向工作的报道仍然较少。因此, 在未来工作中有必要探索不同蛋白表达体系制备诺如病毒 RNA 聚合酶的相关研究。

本研究发现诺如病毒 RdRp 的体外催化活性取决于 Mn^{2+} 离子的存在, 而且 Mn^{2+} 离子浓度为 1 mmol/L 时 GII.P12/GII.3 RdRp 具有最佳催化活性。这与之前的研究结果不同, Bull 等^[39]发现在 pH 7.0 和 $MnCl_2$ 浓度为 2.5 mmol/L 的条件下 GII.P21/GII.3 RdRp 具有最佳催化活性, 这可能与所用方法的差异有关。GII.P12/GII.3 RdRp 在 30 °C 下表现出最佳活性, 这之前报道的人

源诺如病毒 GII.4 Sydney 2012 RdRp 在 35 °C 表现出最佳活性不同^[30]。这可能与它们之间的流行病学适应性差异有关, 因为 GII.4 Sydney 2012 菌株的最佳温度更接近宿主的最佳温度(37 °C)。诺如病毒 GII.P12/GII.3 RdRp 底物和模板的酶动力学曲线符合 Michaelis-Menten 模型。

诺如病毒抑制剂的研究也取得了很大进展。据报道, 利巴韦林通过消耗细胞中的 GTP 和增加病毒基因组的突变来抑制诺如病毒的复制^[40], 半数最大有效浓度约为 40 μ mol/L^[41]。法维拉韦被证明在体内病毒复制过程中引发病毒突变, 并作为底物类似物与聚合酶的活性位点竞争结合以发挥其抗病毒作用^[16,42]。NF023 则能够抑制人源和鼠源诺如病毒的聚合酶活性^[43]。鉴于以上化合物抗病毒的研究基础, 我们进一步研究了它们对 GII.P12/GII.3 RdRp 的影响。本研究结果表明, 利巴韦林、法维拉韦和 NF023 以剂量依赖性方式有效抑制聚合酶活性, IC_{50} 在微摩尔范围内; 而且 IC_{50} 低于报道中 GI.1 型诺如病毒 RdRp 的浓度, 表明对 GII.P12/GII.3 RdRp 活性具有特异性抑制。此外, 与利巴韦林和 NF023 相比, 法维拉韦抑制作用较弱。

综上所述, 本研究首次系统地表征了我国 GII.P12/GII.3 诺如病毒易重组基因型 GII.P12/GII.3 毒株的 RNA 聚合酶特性, 确定了 RdRp 酶活最佳反应条件, 体外抑制试验表明 NF023 是针对 GII.P12/GII.3 诺如病毒感染的抗病毒药物开发的潜在候选者。未来工作中可以使用体外 RdRp 活性分析来构建诺如病毒聚合酶抑制剂库, 进一步筛选针对诺如病毒聚合酶抑制剂, 不断丰富抗病毒药物。

REFERENCES

- [1] Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, Koopmans M, Lopman BA. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis:

- a systematic review and meta-analysis[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2014, 14(8): 725-730
- [2] Trivedi TK, Desai RS, Hall AJ, Patel M, Parashar UD, Lopman BA. Clinical characteristics of norovirus-associated deaths: a systematic literature review[J]. *American Journal of Infection Control*, 2013, 41(7): 654-657
- [3] Ye X, Van JN, Munoz FM, Revell PA, Kozinetz CA, Krance RA, Atmar RL, Estes MK, Koo HL. Noroviruses as a cause of diarrhea in immunocompromised pediatric hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients[J]. *American Journal of Transplantation*, 2015, 15(7): 1874-1881
- [4] Harmalkar DS, Lee SJ, Lu QL, Kim MI, Park J, Lee H, Park M, Lee A, Lee C, Lee K. Identification of novel non-nucleoside vinyl-stilbene analogs as potent norovirus replication inhibitors with a potential host-targeting mechanism[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 184: 111733
- [5] Zhou HL, Wang SM, von Seidlein L, Wang XY. The epidemiology of norovirus gastroenteritis in China: disease burden and distribution of genotypes[J]. *Frontiers of Medicine*, 2020, 14(1): 1-7
- [6] Esposito S, Principi N. Norovirus vaccine: priorities for future research and development[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 1383
- [7] Riddle MS, Walker RI. Status of vaccine research and development for norovirus[J]. *Vaccine*, 2016, 34(26): 2895-2899
- [8] Posovszky C, Buderus S, Classen M, Lawrenz B, Keller KM, Koletzko S. Acute infectious gastroenteritis in infancy and childhood[J]. *Deutsches Arzteblatt International*, 2020, 117(37): 615-624
- [9] Karst SM, Wobus CE, Goodfellow IG, Green KY, Virgin HW. Advances in norovirus biology[J]. *Cell Host & Microbe*, 2014, 15(6): 668-680
- [10] Thorne LG, Goodfellow IG. Norovirus gene expression and replication[J]. *Journal of General Virology*, 2014, 95(2): 278-291
- [11] Campillay-Véliz CP, Carvajal JJ, Avellaneda AM, Escobar D, Covián C, Kalergis AM, Lay MK. Human norovirus proteins: implications in the replicative cycle, pathogenesis, and the host immune response[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 961
- [12] Chhabra P, De Graaf M, Parra GI, Chan MCW, Green K, Martella V, Wang QH, White PA, Katayama K, Vennema H, et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes[J]. *The Journal of General Virology*, 2019, 100(10): 1393-1406
- [13] Vega E, Barclay L, Gregoricus N, Shirley SH, Lee D, Vinjé J. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52(1): 147-155
- [14] Lun J, Hewitt J, Yan G, Enosi Tuipulotu D, Rawlinson W, White P. Recombinant GII.P16/GII.4 Sydney 2012 was the dominant norovirus identified in Australia and New Zealand in 2017[J]. *Viruses*, 2018, 10(10): 548
- [15] Cheung SKC, Kwok K, Zhang LY, Mohammad KN, Lui GCY, Lee N, Nelson EAS, Lai RWM, Leung TF, Chan PKS, et al. Higher viral load of emerging norovirus GII.P16-GII.2 than pandemic GII.4 and epidemic GII.17, Hong Kong, China[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2018, 25(1): 119-122
- [16] Jin ZN, Tucker K, Lin XY, Kao CC, Shaw K, Tan H, Symons J, Behera I, Rajwanshi VK, Dyatkina N, et al. Biochemical evaluation of the inhibition properties of favipiravir and 2'-C-methylcytidine triphosphates against human and mouse norovirus RNA polymerases[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(12): 7504-7516
- [17] Rocha-Pereira J, Jochmans D, Dallmeier K, Leyssen P, Cunha R, Costa I, Nascimento MSJ, Neyts J. Inhibition of norovirus replication by the nucleoside analogue 2'-C-methylcytidine[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 427(4): 796-800
- [18] Rohayem J, Bergmann M, Gebhardt J, Gould E, Tucker P, Mattevi A, Unge T, Hilgenfeld R, Neyts J. Antiviral strategies to control calicivirus infections[J]. *Antiviral Research*, 2010, 87(2): 162-178
- [19] Eltahla AA, Lim KL, Eden JS, Kelly AG, MacKenzie JM, White PA. Nonnucleoside inhibitors of norovirus RNA polymerase: scaffolds for rational drug design[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(6): 3115-3123
- [20] Netzler NE, Enosi Tuipulotu D, Eltahla AA, Lun JH, Ferla S, Brancale A, Urakova N, Frese M, Strive T, MacKenzie JM, et al. Broad-spectrum non-nucleoside inhibitors for caliciviruses[J]. *Antiviral Research*, 2017, 146: 65-75
- [21] Tarantino D, Pezzullo M, Mastrangelo E, Croci R, Rohayem J, Robel I, Bolognesi M, Milani M. Naphthalene-sulfonate inhibitors of human norovirus RNA-dependent RNA-polymerase[J]. *Antiviral Research*, 2014, 102: 23-28
- [22] Rocha-Pereira J, Jochmans D, Debing Y, Verbeken E, Nascimento MSJ, Neyts J. The viral polymerase inhibitor 2'-C-methylcytidine inhibits Norwalk virus replication and protects against norovirus-induced diarrhea and mortality in a mouse model[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(21): 11798-11805

- [23] Ferla S, Netzler NE, Ferla S, Veronese S, Tuipulotu DE, Guccione S, Brancale A, White PA, Bassetto M. *In silico* screening for human norovirus antivirals reveals a novel non-nucleoside inhibitor of the viral polymerase[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 4129
- [24] Mahar JE, Bok K, Green KY, Kirkwood CD. The importance of intergenic recombination in norovirus GII.3 evolution[J]. Journal of Virology, 2013, 87(7): 3687-3698
- [25] Xue L, Wu QP, Dong RM, Cai WC, Wu HM, Chen MT, Chen G, Wang J, Zhang JM. Comparative phylogenetic analyses of recombinant noroviruses based on different protein-encoding regions show the recombination-associated evolution pattern[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 4976
- [26] Kuang XZ, Teng Z, Zhang X. Genotypic prevalence of norovirus GII in gastroenteritis outpatients in Shanghai from 2016 to 2018[J]. Gut Pathogens, 2019, 11: 40
- [27] Lu QB, Huang DD, Zhao J, Wang HY, Zhang XA, Xu HM, Qu F, Liu W, Cao WC. An increasing prevalence of recombinant GII norovirus in pediatric patients with diarrhea during 2010–2013 in China[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2015, 31: 48-52
- [28] Xue L, Dong RM, Wu QP, Li YL, Cai WC, Kou XX, Zhang JM, Guo WP. Molecular epidemiology of noroviruses associated with sporadic gastroenteritis in Guangzhou, China, 2013-2015[J]. Archives of Virology, 2016, 161(5): 1377-1384
- [29] Singer VL, Jones LJ, Yue ST, Haugland RP. Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation[J]. Analytical Biochemistry, 1997, 249(2): 228-238
- [30] Urakova N, Netzler N, Kelly A, Frese M, White P, Strive T. Purification and biochemical characterisation of rabbit calicivirus RNA-dependent RNA polymerases and identification of non-nucleoside inhibitors[J]. Viruses, 2016, 8(4): 100
- [31] Deval J, Jin ZN, Chuang YC, Kao CC. Structure(s), function(s), and inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase of noroviruses[J]. Virus Research, 2017, 234: 21-33
- [32] Freedman H, Kundu J, Tchesnokov EP, Law JLM, Nieman JA, Schinazi RF, Tyrrell DL, Gotte M, Houghton M. Application of molecular dynamics simulations to the design of nucleotide inhibitors binding to norovirus polymerase[J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2020, 60(12): 6566-6578
- [33] Ebenezer O, Jordaan MA, Damoyi N, Shapi M. Discovery of potential inhibitors for RNA-dependent RNA polymerase of norovirus: virtual screening, and molecular dynamics[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 22(1): 171
- [34] Bull RA, Eden JS, Rawlinson WD, White PA. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage[J]. PLoS Pathogens, 2010, 6(3): e1000831
- [35] Ng KKS, Pendás-Franco N, Rojo J, Boga JA, Machín À, Alonso JMM, Parra F. Crystal structure of Norwalk virus polymerase reveals the carboxyl terminus in the active site cleft[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(16): 16638-16645
- [36] 敖元云, 徐锦, 段招军. GII.P16 型诺如病毒聚合酶蛋白的原核表达、活性测定和结晶[J]. 国际病毒学杂志, 2021, 28(3): 210-213
- Ao YY, Xu J, Duan ZJ. Prokaryotic expression, activity determination and crystallization of polymerase protein of GII.P16 norovirus[J]. International Journal of Virology, 2021, 28(3): 210-213 (in Chinese)
- [37] Hobson SD, Rosenblum ES, Richards OC, Richmond K, Kirkegaard K, Schultz SC. Oligomeric structures of poliovirus polymerase are important for function[J]. The EMBO Journal, 2001, 20(5): 1153-1163
- [38] Kashiwagi T, Hara K, Kohara M, Kohara K, Iwahashi J, Hamada N, Yoshino H, Toyoda T. Kinetic analysis of C-terminally truncated RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 290(4): 1188-1194
- [39] Bull RA, Hyde J, MacKenzie JM, Hansman GS, Oka T, Takeda N, White PA. Comparison of the replication properties of murine and human calicivirus RNA-dependent RNA polymerases[J]. Virus Genes, 2011, 42(1): 16-27
- [40] Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong WD, Lau JYN, Hong Z, Andino R, Cameron CE. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen[J]. Nature Medicine, 2000, 6(12): 1375-1379
- [41] Costantini VP, Whitaker T, Barclay L, Lee D, McBrayer TR, Schinazi RF, Vinjé J. Antiviral activity of nucleoside analogues against norovirus[J]. Antiviral Therapy, 2012, 17(6): 981-991
- [42] Arias A, Thorne L, Goodfellow I. Favipiravir elicits antiviral mutagenesis during virus replication *in vivo*[J]. eLife, 2014, 3: e03679
- [43] Mastrangelo E, Pezzullo M, Tarantino D, Petazzi R, Germani F, Kramer D, Robel I, Rohayem J, Bolognesi M, Milani M. Structure-based inhibition of norovirus RNA-dependent RNA polymerases[J]. Journal of Molecular Biology, 2012, 419(3/4): 198-210