

新冠病毒的复制周期

新冠病毒的结构与基因组

冠状病毒是球形包膜病毒，含有单股正义 RNA（类似宿主的 mRNA），长度约为 26 至 32kb。

其他三种结构蛋白是包膜、膜和核衣壳蛋白。

基因组的前三分之二由2个大型重叠的开放阅读框 ORF 组成，编码16种非结构蛋白，包括蛋白酶、RNA 依赖性RNA聚合酶（prRdRp）、RNA螺旋酶、引物酶等，它们组成了病毒复制酶复合体。

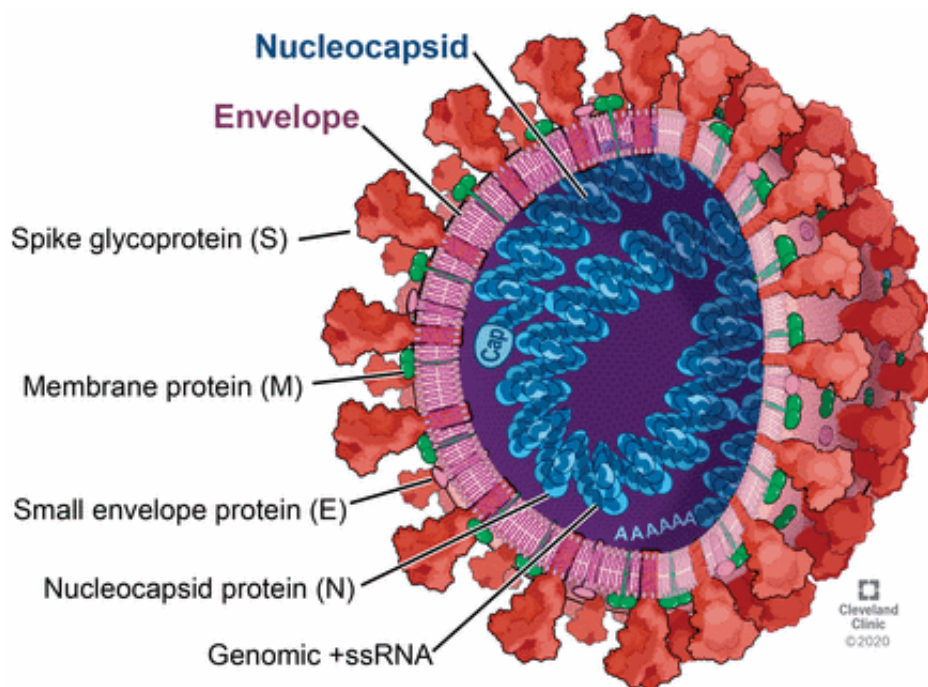


figure 1：新型冠状病毒的结构。

新冠病毒进入人体细胞的步骤

病毒进入人体细胞需要结合血管紧张素转换酶2（ACE2）受体，并由丝氨酸蛋白酶TMPRSS2进行裂解，以允许病毒与宿主膜融合。

下呼吸道组织中的肺细胞和肺巨噬细胞主要表达ACE2，这与SARS-CoV-2在上呼吸道上皮细胞中大量复制并有效传播的事实相一致。

其他细胞蛋白酶（如呋喃酶）通过内细胞途径（the endocytic pathway）促进新冠病毒以pH值依赖性方式的进入人体细胞。

总体来说，病毒进入人体细胞的主要途径是细胞类型特异性的，并依赖于特定蛋白酶的可用性。

冠状病毒spike蛋白是病毒附着和进入靶细胞的关键决定因子。病毒的进入涉及2个spike蛋白亚单位，它们介导不同的功能。S1亚单位通过受体结合域介导ACE2的附着。S2亚单位含有融合肽和跨膜结构域，驱动病毒和宿主细胞膜的融合。为了激活融合，spike蛋白必须在细胞膜上的2个位点直接裂解，或通过核内体（endosome）裂解，或同时裂解。裂解位点的序列，一个位于S1和S2亚单位的边界，另一个（S2'）在S2内，正好位于融合肽的上游，为各种细胞蛋白酶提供底物，并决定裂解效率。

新冠病毒的感染途径或路线取决于不同类型的细胞中可用的蛋白酶和蛋白酶的裂解位点。

新冠病毒在人体细胞内的复制

进入宿主细胞后，冠状病毒基因组释放到细胞质中，标志着病毒基因表达复杂程序的开始。

figure 2: SARS-COV-2的复制

病毒基因组翻译

在新冠病毒完成脱衣壳（uncoating）和病毒RNA释放到细胞质中后，开放阅读框1a（ORF1a）和ORF1ab的翻译产生两种多聚蛋白：pp1a和pp1ab。这些蛋白又被病毒蛋白酶（由ORF1a编码）处理，产生16种非结构性蛋白。

pp1ab 是由 ORF1a 和 ORF1b 4短重叠的编程1核糖体移码产生的。核糖体分析显示，在 SARS-CoV-2 中，ORF1a 和 ORF1b 之间的转移效率介于45% 至70% 之间，这与小鼠肝炎病毒(MHV)61 的转移效率相似。这决定了 pp1a 和 pp1ab 之间的化学计量关系，pp1a 的表达量大约是 pp1ab 的1.4-2.2倍。

16种非结构蛋白在位于nsp3（木瓜蛋白酶样蛋白酶；PLpro）和nsp5（糜蛋白酶样蛋白酶）内的两种半胱氨酸蛋白酶的蛋白裂解下，从pp1a（nsp1-11）和pp1ab（nsp1-10，nsp12-16）共同翻译和翻译后释放。

驻扎在nsp5中的蛋白酶经常被称为3C样蛋白酶（3CLpro），它负责大部分多聚蛋白裂解位点的蛋白溶解处理。

nsp2-16组成了病毒的RTC，并被定向到确定的亚细胞位置，在那里与宿主细胞因子的相互作用决定了复制周期的进程。

nsp2-11被认为提供了适应病毒RTC的必要支持功能，如调节细胞内膜、宿主免疫规避和为复制提供辅助因子。

病毒 RTC 的建立对病毒复制至关重要，因此是抗 SARS-CoV-2的有希望的靶点。

nsp12-16则含有参与RNA合成、RNA校对和RNA修饰的核心酶功能。

nsp14提供一种3'-5'的外切酶活性，以独特的RNA校对功能协助RNA的合成。

尚未完全阐明的冠状病毒盖帽机制由nsp10（作为辅助因子）、nsp13（提供RNA 5'-三磷酸酶活性）以及nsp14和nsp16（分别执行N7-甲基转移酶和2'-O-甲基转移酶功能）组成。

新冠病毒RNA合成是由nsp12 RNA依赖性RNA聚合酶（RdRP）及其两个辅助因子nsp7和nsp8完成的，后者拟具有引物酶或3'-末端腺苷转移酶活性。

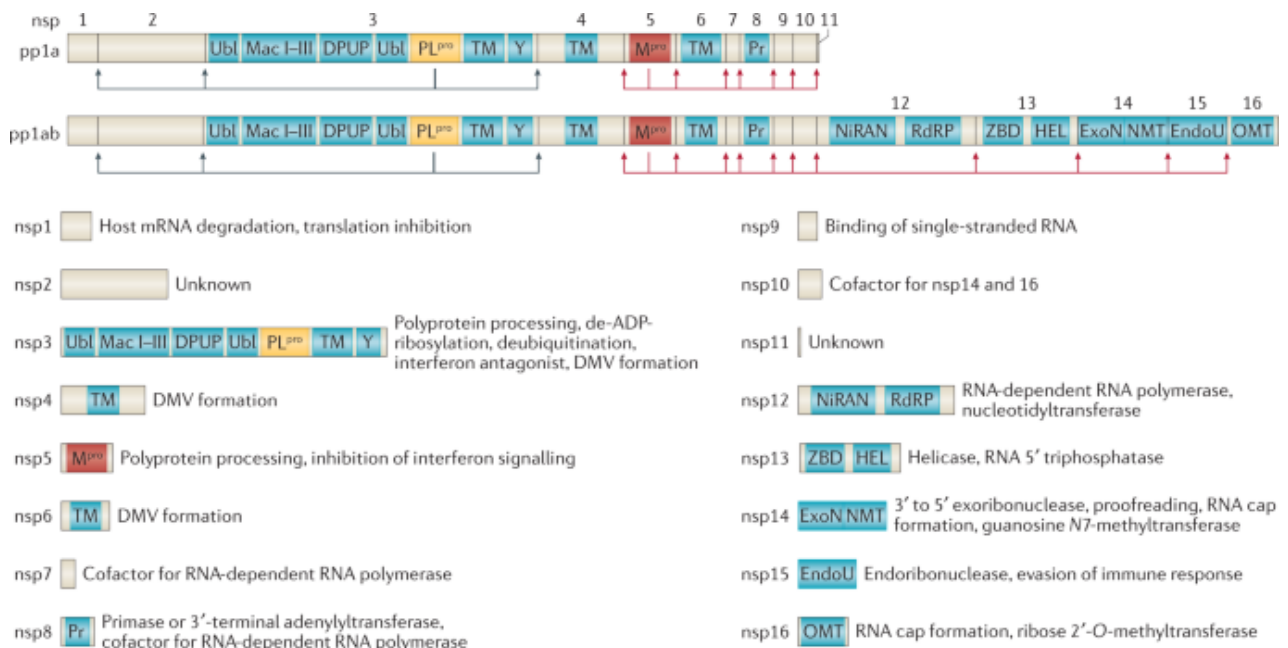


figure 3: 冠状病毒多蛋白及非结构蛋白

RNA合成

病毒的基因组复制是通过合成全长的负义基因组拷贝开始的，这些拷贝的功能是生成新的正义基因组RNA的模板。这些新合成的基因组被用于翻译以产生更多的nsps和RTCs，或被包装成新的病毒。

冠状病毒的一个特点是不连续的病毒转录过程。病毒利用粗糙的内质网（ER）衍生的膜来形成RNA复制酶-转录酶复合物（RTC）。RTC驱动（-）RNA的合成。

在负链RNA的合成过程中，RTC在遇到转录调控序列（TRSs）后中断转录，这些序列位于病毒基因组3'三分之一处大多数ORFs的上游。

在这些TRS元件（也称为TRS "体"）上，负链RNA的合成停止，并在与位于距基因组5'端约70个核苷酸的领导序列（TRS-L）相邻的TRS上重新启动。

冠状病毒RNA合成的这一不连续步骤涉及新生的负链RNA（负义TRS体）和正链基因组RNA（正义TRS-L）的互补TRS之间的相互作用。在TRS-L区域重新启动RNA的合成时，一个负链拷贝的领导序列被添加到新生的RNA中，以完成负链sgRNA的合成。负链RNA合成的不连续步骤导致产生一组负链sgRNAs，然后作为模板合成一组特征嵌套的正义sg mRNAs，翻译成结构和附属蛋白。

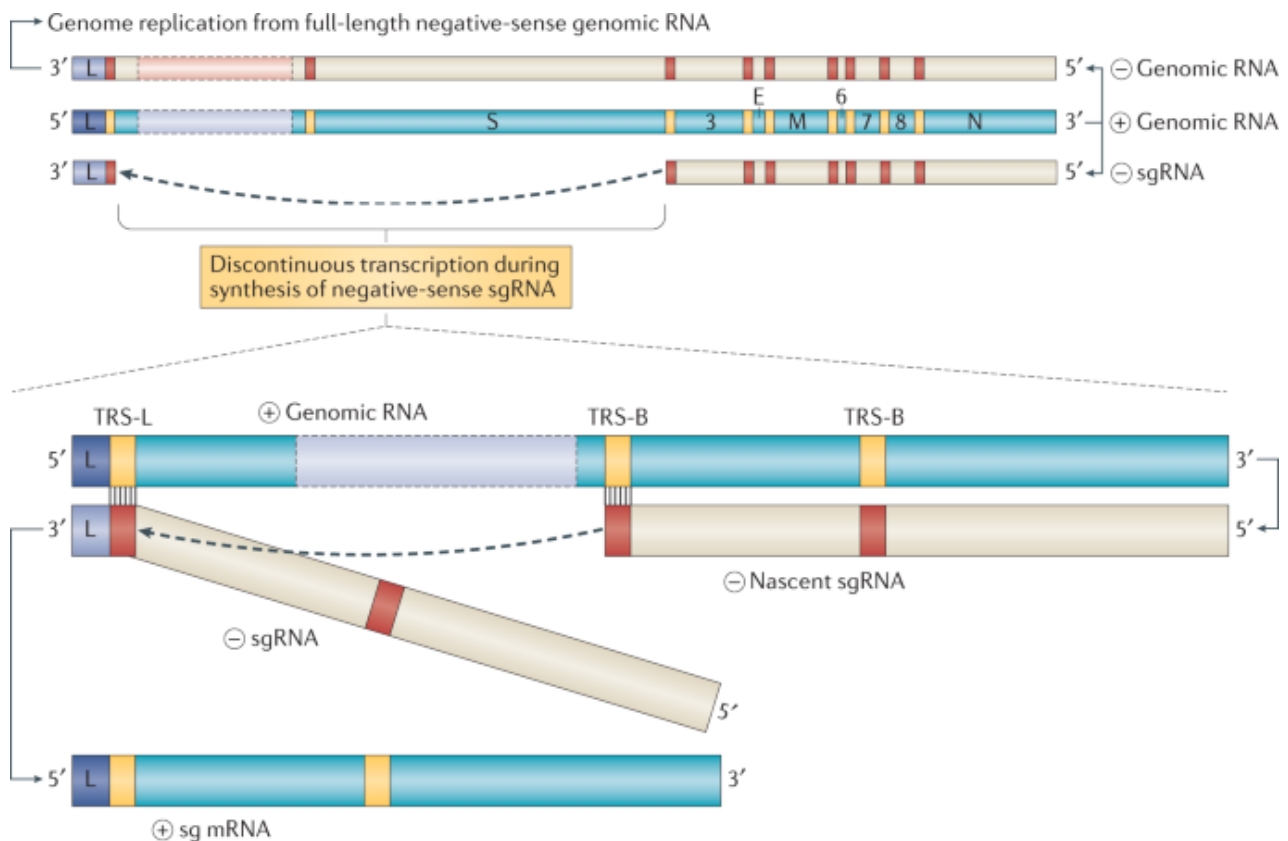


figure 4: 新冠病毒复制及不连续转录

结构蛋白和辅助蛋白的表达

编码结构蛋白（即S蛋白、包膜（E）蛋白、膜（M）蛋白和核壳（N）蛋白）的ORF位于冠状病毒基因组的3'三分之一处。穿插在这些ORF之间的是编码所谓的附属蛋白的ORF。

一般来说，冠状病毒的结构蛋白在内质网（ER）到高尔基体区间组装并协助新病毒的出芽，这些病毒被认为是通过胞吐作用离开被感染的细胞。然而，最近的证据表明，冠状病毒可能通过溶酶体贩运途径排出感染的细胞。

复制周期

复制细胞器是冠状病毒复制的一个保守的特征，与其他正义RNA病毒感染中所建议的细胞内膜的作用一致，它们提供了一个有利的位置，有足够浓度的RNA合成所需的大分子，同时防止病毒复制中间物暴露在细胞膜先天免疫中。

尽管复制细胞器的形成机制还不完全清楚，但跨膜的nsp3、nsp4和nsp6的协同作用已被认为是将宿主内膜转入复制细胞器的过程。

冠状病毒感染，像许多其他正义RNA病毒一样，表现为产生ER衍生的和相互连接的核周围双膜结构，如双膜囊泡（DMVs）、卷曲膜和最近发现的双膜球状体。而且，这些结构都是高度动态的，在病毒的生命周期中不断发展。但是，病毒RNA合成的具体位置目前仍不清楚。不过，通过对新合成的病毒RNA进行代谢标记，显示病毒RNA的合成发生在DMV内。

参考文献

Silverman, Robert H. "COVID-19: Coronavirus replication, pathogenesis, and therapeutic strategies." *Cleveland Clin J Med* 87.6 (2020): 321.

V'kovski, Philip, et al. "Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2." *Nature Reviews Microbiology* 19.3 (2021): 155-170.