

分类号:

密 级: 公开

学 号: 20222313204

单位代码: 10759

# 石河子大学

## 博 士 学 位 论 文



### 宿主抗病毒因子 RPL35 和 STING1 抑制口蹄疫 病毒复制的机制研究

学 位 申 请 人	邵文华
指 导 教 师	赵宗胜 教授 朱紫祥 研究员
申请学位门类级别	农学 博士
学 科、专 业 名 称	畜牧学
研 究 方 向	动物生产与疾病控制
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子

2026 年 5 月

分类号:

学号: 20222313204

密级: 公开

单位代码: 10759

# 石河子大学

## 博士学位论文



### 宿主抗病毒因子 RPL35 和 STING 抑制口蹄疫病毒复制的机制研究

学位申请人	邵文华
指导教师	赵宗胜 教授 朱紫祥 研究员
申请学位门类级别	农学 博士
学科、专业名称	畜牧学
研究方向	动物生产与疾病控制
所在学院	动物科技学院

中国·新疆·石河子

2026 年 5 月

**Mechanism Study of Host Antiviral Factors RPL35 and STING1 in  
Inhibiting Foot-and-Mouth Disease Virus Replication**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Doctor of Agriculture**

By

**Shao Wen Hua**

**(Animal Production and Disease Control)**

Dissertation Supervisor: Prof. Zhao Zong Sheng

Prof. Zhu Zi Xiang

May, 2026

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：邵文军

时间： 2026 年 5 月 22 日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：邵文军

时间： 2026 年 5 月 22 日

导师签名：赵明

时间： 2026 年 5 月 22 日

## 课题来源

国家自然科学基金（项目编号 32330107）

国家重点研发计划（项目编号 CARS-35）

国家生猪技术创新中心（项目编号 NCTIP-XD/C03）

## 摘要

目的：FMDV 是危害畜牧业的重要病原，编码 4 种结构蛋白和 8 种非结构蛋白。FMDV 完成生命周期依赖宿主蛋白，而宿主限制因子则通过多种机制抑制病毒的复制和传播。本研究前期以病毒蛋白作为诱饵蛋白，通过免疫共沉淀-质谱联用技术（IP-MS），筛选获得一批候选宿主因子，构建了宿主质粒库，并通过病毒感染实验筛选出显著抑制 FMDV 复制的宿主因子 RPL35 和 STING1。因此，本课题将从宿主限制因子如何以病毒蛋白为靶点抑制病毒复制和病毒如何逃逸宿主限制因子的抗病毒作用两方面开展研究。

### 1. RPL35 介导的抗病毒作用与 FMDV 的逃逸作用

方法：（1）利用免疫共沉淀（CO-IP）和间接免疫荧光验证 RPL35 与 FMDV VP2 相互作用和共定位。（2）采用 RT-qPCR、病毒滴度（TCID<sub>50</sub>）、Western blotting 分析过表达或敲低 RPL35 对 FMDV 复制的影响。（3）利用 RT-qPCR 检测 RPL35 对 FMDV 吸附、内化、翻译、RNA 合成、组装与释放的影响。（4）使用药物抑制剂 MG132、NH<sub>4</sub>Cl、Z-VAD-FMK 等筛选 RPL35 降解 VP2 的通路及 VP2 泛素化类型。（5）通过定点突变 PCR 技术构建 VP2 突变体（K2R、K3R、K63R、K88R、K159R、K172R、K175R、K198R 及 K217R），检测 VP2 发生泛素化的关键位点。（6）利用 MegAlign 比较了 FMDV VP2 七种血清型的氨基酸序列。（7）利用反向遗传技术构建 K217R 突变病毒（rVP2-K217R），检测其对乳鼠的致病性。（8）通过 IP-MS 筛选出 RPL35 招募的 E3 泛素连接酶，检测 E3 泛素连接酶对 RPL35 介导的 VP2 蛋白及泛素化。（9）利用间接免疫荧光筛选抑制 RPL35 核转位的病毒蛋白及核质转运蛋白。

结果：（1）免疫共沉淀（CO-IP）和间接免疫荧光实验发现 RPL35 与 FMDV VP2 发生相互作用且在细胞质中共定位。（2）过表达或敲低 RPL35，正反两方面证实 RPL35 显著抑制 FMDV 复制。（3）RPL35 抑制病毒的 RNA 合成、组装和释放过程。（4）RPL35 通过蛋白酶体通路显著抑制 VP2 的蛋白水平表达，且促进 VP2 发生 K48 链接的多聚泛素化。（5）VP2 K217R 突变削弱 RPL35 对 VP2 的泛素化。（6）通过 MegAlign 分析了 FMDV VP2 七种血清型的氨基酸序列，发现 217 位赖氨酸残基是保守的。（7）IP-MS 筛选出 RPL35 招募 E3 泛素连接酶 AMFR，敲低 AMFR 后，VP2 蛋白降解及泛素化都减弱。（8）利用反向遗传技术构建 K217R 突变病毒（rVP2-K217R），乳鼠攻毒实验发现突变病毒致死率显著高于亲本毒，且 rVP2-K217R 感染加剧肺泡萎缩等肺部病理损伤，说明 K217 位点是 RPL35 介导的抗病毒作用的关键靶点。（9）通过间接免疫荧光和免疫共沉淀（CO-IP）证实 FMDV 通过 2B 和 L 降解 KPNA3，阻断 RPL35 核转位，从而逃逸 RPL35 介导的抗病毒作用。

结论：RPL35 通过招募 AMFR 促进 VP2 的泛素化降解，负调控 FMDV 复制；而 FMDV 则通过降解 KPNA3 抑制 RPL35 的核转位以逃逸宿主抗病毒应答。

### 2. STING1 抗 FMDV 复制机制与病毒逃逸作用

方法：（1）采用 RT-qPCR、病毒滴度（TCID<sub>50</sub>）、Western blotting 分析过表达或敲低 STING1

对 FMDV 复制的影响。(2) 利用干扰素缺陷的细胞 (BHK-21 和 IBRS-2)、敲除 IRF3、敲低 TBK1、IFNAR1 和 PERK 分子,检测过表达 STING1 对病毒复制的影响。(3)通过 RT-qPCR、病毒滴度(TCID<sub>50</sub>)、Western blotting 检测 STING1 稳定剂 SB24011 对 FMDV 复制周期的影响。(4) 采用 RT-qPCR、病毒滴度(TCID<sub>50</sub>)、Western blotting 检测 STING1 稳定剂 SB24011 对小 RNA 病毒 SVA、EV71 及 EMCV 的抗病毒作用。(5) 动物实验,检测 SB24011 治疗下 FMDV 对小鼠的致病性。(6) 采用 RT-qPCR 及 Western blotting 检测 FMDV 感染对 STING1 的影响。(7) 使用药物抑制剂 MG132、NH<sub>4</sub>CL、Z-VAD-FMK 等筛选 3C 和 2B 降解 STING1 的通路。(8) 免疫共沉淀 (CO-IP) 验证 STING1 及其酶活性突变体与 3C 相互作用。(9) 其它小 RNA 病毒科病毒 3C 对 STING1 的降解作用。(10) 使用 AlphaFold3 预测小 RNA 病毒科 3C 模型与 STING1 的蛋白质相互结构模型。

结果: (1) 本研究发现 STING1 同样具有显著抑制 FMDV 复制的作用。(2) 与已知的 STING1 通过天然免疫发挥抗病毒作用不同, 本研究发现 STING1 以不依赖干扰素的方式抑制 FMDV 复制, 在干扰素缺陷的 BHK-21 和 IBRS-2 细胞中, 以及 IRF3、TBK1、IFNAR1 及 PERK 敲除或敲低的 PK-15 细胞中, STING1 仍保留抗病毒活性。(3) 研究发现 STING1 稳定剂 SB24011 可增强 STING1 表达, 抑制 FMDV 复制, 且该作用发生于 IRES 依赖性翻译阶段。(4) 实验证明, 药物 SB24011 对 SVA、EV71 及 EMCV 等病毒也具有广谱抗病毒活性。(5) 小鼠攻毒实验证实, SB24011 治疗显著减轻 FMDV 诱导的组织损伤。(6) 病毒感染 IBRS-2 细胞的免疫印迹检测显示, FMDV 感染下调 STING1 表达, 进一步研究发现 FMDV 3C 蛋白酶通过其酶活性降解 STING1, 而 FMDV 2B 蛋白在 mRNA 水平抑制 STING1。(7) 3C 降解 STING1 不依赖蛋白酶体、自噬溶酶体和凋亡通路。(8) STING1 与酶活性突变体 (Flag-3C-H46Y、Flag-3C-D84N 和 Flag-3C-C163G) 均能发生相互作用。(9) PV、EV71、Cox 和 FMDV 编码的 3C 都能降解 STING1。(10) 结构分析表明, 不同小 RNA 病毒的 3C 蛋白 (包括 Cox 3C、EV71 3C、FMDV 3C、PV 3C 和 SVA 3C) 均结合于 STING1 的同一结构域附近, 这一结果表明, 小 RNA 病毒可能演化出了一种保守的机制, 通过其 3C 蛋白酶靶向结合 STING1 的同一关键位点, 从而实施免疫逃逸。

结论: STING1 不依赖于干扰素通路抑制 FMDV 复制, STING1 稳定剂 SB24011 可通过病毒翻译, 有效抑制 FMDV 复制。反之, FMDV 感染抑制 STING1 蛋白的表达, FMDV 3C 蛋白酶通过酶解活性和 2B 蛋白在转录水平协同下调 STING1 表达的双重逃逸机制。

**关键词:** 口蹄疫病毒; RPL35; STING1; VP2; 3C

## Abstract

Objective: FMDV is an important pathogen harmful to animal husbandry, encoding 4 structural proteins and 8 non structural proteins. The completion of FMDV life cycle depends on the host protein, while the host limiting factor inhibits the replication and transmission of the virus through a variety of mechanisms. In the early stage of this study, viral protein was used as bait protein, and a batch of candidate host factors were screened by immunoprecipitation mass spectrometry (IP-MA). The host plasmid library was constructed, and the host factors RPL35 and STING1 that significantly inhibit FMDV replication were screened by virus infection experiment. Therefore, this project will focus on two aspects: how the host restriction factor can inhibit virus replication by targeting viral protein and how the virus can escape the antiviral effect of the host restriction factor.

### 1. RPL35 mediated antiviral effect and FMDV escape effect

Methods: (1) CO-IP and indirect immunofluorescence were used to verify the interaction and co localization of RPL35 and FMDV VP2. (2) RT-qPCR, virus titer (TCID<sub>50</sub>) and Western blotting were used to analyze the effect of overexpression or knockdown of RPL35 on FMDV replication. (3) RT-qPCR was used to detect the effects of RPL35 on FMDV adsorption, internalization, translation, RNA synthesis, assembly and release. (4) Drug inhibitors MG132, NH<sub>4</sub>Cl and z-VAD-FMK were used to screen the pathway of RPL35 degrading VP2 and the type of VP2 ubiquitination. (5) VP2 mutants (K2R、K3R、K63R、K88R、K159R、K172R、K175R、K198R and K217R) were constructed by site directed mutagenesis PCR, and the key sites of VP2 ubiquitination were detected. (6) The amino acid sequences of seven serotypes of foot-and-mouth disease virus VP2 were compared by using megalign. (7) The K217R mutant virus (rVP2-k217R) was constructed by reverse genetics technology, and its pathogenicity to suckling mice was detected. (8) The E3 ubiquitin ligase recruited by RPL35 was screened by ip-ms. the effect of E3 ubiquitin ligase on RPL35 mediated VP2 protein and ubiquitination was detected. (9) Indirect immunofluorescence was used to screen viral proteins and nucleocytoplasmic transporters that inhibit the nuclear translocation of RPL35.

Results: (1) CO-IP and indirect immunofluorescence showed that RPL35 interacted with FMDV VP2 and Co located in the cytoplasm. (2) Overexpression or knockdown of RPL35 confirmed that RPL35 significantly inhibited FMDV replication. (3) RPL35 inhibits viral RNA synthesis, assembly and release. (4) RPL35 significantly inhibited the protein expression of VP2 through proteasome pathway, and promoted the polyubiquitination of K48 link in VP2. (5) VP2 K217R mutation weakens the ubiquitination of VP2 by

RPL35. (6) The amino acid sequences of seven serotypes of foot-and-mouth disease virus VP2 were analyzed by megalign. It was found that the Lysine residue at position 217 was conserved. (7) IP-MS screened that RPL35 recruited E3 ubiquitin ligase AMFR. After knockdown of AMFR, VP2 protein degradation and ubiquitination were weakened. (8) The K217R mutant virus (rVP2-K217R) was constructed by reverse genetics technology. The lethal rate of the mutant virus was significantly higher than that of the parent virus in suckling mice. The rVP2-K217R infection exacerbated lung pathological damage such as alveolar atrophy, indicating that K217 site is the key target of RPL35 mediated antiviral effect.(9) Through indirect immunofluorescence and co-immunoprecipitation (CO-IP), it was confirmed that FMDV degrades KPNA3 via 2B and L, blocks the nuclear translocation of RPL35, and thereby evades the antiviral effect mediated by RPL35.

Conclusion: RPL35 promotes the ubiquitination and degradation of VP2 by recruiting AMFR, and negatively regulates FMDV replication; However, FMDV can inhibit the nuclear translocation of RPL35 by degrading KPNA3 to escape the host antiviral response.

## 2. The anti-FMDV replication mechanism of STING1 and its role in viral escape

Methods: (1) RT-qPCR, virus titer (TCID<sub>50</sub>) and Western blotting were used to analyze the effect of overexpression or knockdown of STING1 on FMDV replication. (2) Interferon deficient cells (BHK-21 and IBRS-2), IRF3 knockdown, TBK1 knockdown, IFNAR1 and PERK knockdown were used to detect the effect of overexpression of STING1 on virus replication. (3) RT-qPCR, virus titer (TCID<sub>50</sub>) and Western blotting were used to detect the effect of STING1 stabilizer SB24011 on the replication cycle of FMDV. (4) RT-qPCR, virus titer (TCID<sub>50</sub>) and Western blotting were used to detect the antiviral effect of STING1 stabilizer SB24011 on small RNA virus SVA, EV71 and EMCV. (5) Animal experiments were conducted to detect the pathogenicity of FMDV in mice treated with SB24011. (6) RT-qPCR and Western blotting were used to detect the effect of FMDV infection on STING1. (7) Drug inhibitors MG132, NH<sub>4</sub>Cl, z-VAD-FMK were used to screen the pathway of 3C and 2B degrading STING1. (8) Co-immunoprecipitation (CO-IP) was used to verify the interaction between STING1 and its enzyme activity mutants and 3C. (9) The degradation effect of 3C from other Picornaviridae viruses on STING1. (10) Use AlphaFold3 to predict the protein interaction structure model between the 3C model of Picornaviridae and STING1.

Results: (1) STING1 also significantly inhibited FMDV replication. (2) This experiment demonstrates that, unlike the known antiviral role of STING1 through innate immunity, our study found that STING1 inhibits FMDV replication in an interferon-independent manner. In interferon-deficient BHK-21 and IBRS-2 cells, as well as in PK-15 cells with knocked-out or knocked-down IRF3, TBK1, IFNAR1, and PERK, STING1 still retains antiviral activity. (3) It was found that STING1 stabilizer SB24011 could enhance the expression of STING1 and inhibit FMDV replication, and this effect occurred in IRES dependent translation stage. (4) Experiments showed that the drug SB24011 also had broad-spectrum

antiviral activity against SVA, EV71, EMCV and other viruses. (5) The challenge test in mice confirmed that SB24011 treatment significantly reduced FMDV induced tissue damage. (6) Western blot analysis of virus infected IBRS-2 cells showed that FMDV infection down regulated the expression of STING1. Further studies showed that the 3C protease of foot-and-mouth disease virus degraded STING1 through its enzyme activity, while the 2B protein of foot-and-mouth disease virus inhibited STING1 at the mRNA level. (7) 3C degradation of STING1 is independent of proteasome, autophagy lysosome and apoptosis pathways. (8) STING1 can interact with enzyme activity mutants (Flag-3C-H46Y, Flag-3C-D84N and Fag-3C-C163G). (9) The 3C encoded by PV, EV71, Cox and FMDV can degrade STING1. (10) Structural analysis showed that the 3C proteins of different small RNA viruses (including Cox 3C, EV71 3C, FMDV 3C, PV 3C and SVA 3C) were all bound to the same domain of STING1. This result showed that the small RNA virus may have evolved a conservative mechanism by targeting the same key site of STING1 through its 3C protease, so as to implement immune escape.

Conclusion: STING1 does not depend on interferon pathway to inhibit FMDV replication. STING1 stabilizer SB24011 can effectively inhibit FMDV replication through viral translation. On the contrary, FMDV infection inhibits the expression of STING1 protein, and FMDV 3C protease cooperatively down regulates the expression of STING1 at the transcriptional level through the dual escape mechanism of enzymatic activity and 2B protein.

**Key words:** FMDV; RPL35; STING1; VP2; 3C; 2B

# 目 录

第 1 章 绪论 .....	1
1.1 研究背景及目的意义 .....	1
1.2 口蹄疫 .....	1
1.2.1 口蹄疫病毒基因组组成 .....	2
1.2.2 口蹄疫病毒粒子结构 .....	3
1.2.3 口蹄疫病毒的复制周期 .....	3
1.2.4 口蹄疫病毒的结构与功能 .....	6
1.2.5 口蹄疫的流行病学 .....	10
1.3 核糖体蛋白 .....	11
1.3.1 核糖体的组成和功能 .....	11
1.3.2 核糖体蛋白在病毒生命周期中的作用 .....	11
1.4 STING1 蛋白 .....	13
1.4.1 STING1 的蛋白结构 .....	13
1.4.2 STING1 在病毒中的作用 .....	14
1.5 泛素化修饰调控病毒复制作用 .....	15
1.5.1 泛素 .....	15
1.5.2 泛素化系统 .....	15
1.5.3 泛素化修饰调控病毒复制作用 .....	16
1.6 主要研究内容 .....	18
1.6.1 RPL35 抑制口蹄疫病毒复制机制研究 .....	18
1.6.2 口蹄疫病毒拮抗 RPL35 的抗病毒作用 .....	19
1.6.3 STING1 抑制口蹄疫病毒复制机制研究 .....	19
1.6.4 口蹄疫病毒拮抗 STING1 的抗病毒作用 .....	20
1.7 研究技术路线 .....	20
第 2 章 RPL35 抑制口蹄疫病毒复制机制研究 .....	22
2.1 引言 .....	22
2.2 材料与方法 .....	22
2.2.1 细胞与病毒 .....	22
2.2.2 试剂和抗体 .....	23
2.2.3 质粒构建 .....	23
2.2.4 溶液的配制 .....	24

2.2.5	主要实验仪器	24
2.2.6	细胞传代培养	25
2.2.7	细胞转染	25
2.2.8	免疫共沉淀试验 (Co-IP)	25
2.2.9	Western blotting	26
2.2.10	激光共聚焦试验	26
2.2.11	蛋白酶体、溶酶体和凋亡通路抑制剂试验	27
2.2.12	RNA 的提取	27
2.2.13	RT-qPCR	27
2.2.14	RNA 干扰试验	28
2.2.15	双荧光报告试验	28
2.2.16	病毒滴度测定	28
2.2.17	细胞活力测定	29
2.2.18	统计学分析	29
2.3	结果与分析	29
2.3.1	免疫共沉淀验证 RPL35 与 FMDV VP2 的相互作用	29
2.3.2	间接免疫荧光验证 RPL35 与 FMDV VP2 之间的共定位	30
2.3.3	RPL35 与 FMDV VP2 的相互作用的区域筛选	31
2.3.4	过表达 RPL35 对 FMDV 复制的影响	32
2.3.5	RPL35 特异性 siRNA 筛选	33
2.3.6	下调 RPL35 对 FMDV 复制的影响	34
2.3.7	RPL35 对 FMDV 吸附和内化的影响	35
2.3.8	RPL35 对 FMDV mRNA 翻译的影响	36
2.3.9	RPL35 对病毒 RNA (vRNA) 合成的影响	37
2.3.10	RPL35 对病毒组装或释放的影响	39
2.4	讨论	40
2.5	小结	40
第 3 章	口蹄疫病毒拮抗 RPL35 的抗病毒作用	41
3.1	引言	41
3.2	材料与方法	41
3.2.1	细胞与病毒	41
3.2.2	试剂和抗体	42
3.2.3	质粒构建	42
3.2.4	溶液的配制	43

3.2.5 主要实验仪器 .....	44
3.2.6 细胞传代培养 .....	44
3.2.7 细胞转染 .....	44
3.2.8 Western blotting .....	44
3.2.9 RNA 的提取 .....	44
3.2.10 RT-qPCR .....	44
3.2.11 激光共聚焦试验 .....	45
3.2.12 蛋白酶体、溶酶体和凋亡通路抑制剂试验 .....	45
3.2.13 银染检测 .....	45
3.2.14 细胞活力测定 .....	45
3.2.15 免疫共沉淀试验 (Co-IP) .....	45
3.2.16 泛素化试验 .....	46
3.2.17 重组口蹄疫病毒的构建 .....	46
3.2.18 动物实验 .....	46
3.2.19 组织病理学评估 .....	46
3.2.20 统计学分析 .....	47
3.3 结果与分析 .....	47
3.3.1 RPL35 对 VP2 的影响 .....	47
3.3.2 RPL35 对 VP2 半衰期的影响 .....	48
3.3.3 RPL35 降解 VP2 的通路研究 .....	48
3.3.4 RPL35 降解 VP2 的关键区域 .....	49
3.3.5 RPL35 对 VP2 蛋白泛素化影响 .....	50
3.3.6 RPL35 影响的 VP2 多聚泛素化的类型 .....	51
3.3.7 RPL35 对 VP2 蛋白内源泛素化影响 .....	52
3.3.8 VP2 上的特异性泛素化位点鉴定 .....	52
3.3.9 VP2 K217 残基分析 .....	53
3.3.10 突变病毒 (rVP2-K217R) 对乳鼠存活率的影响 .....	54
3.3.11 突变病毒 (rVP2-K217R) 对 FMDV mRNA 转录的影响 .....	55
3.3.12 突变病毒感染乳鼠后组织病理分析 .....	56
3.3.13 RPL35 与 E3 连接酶 AMFR 相互作用 .....	56
3.3.14 AMFR 对 VP2 蛋白的影响 .....	57
3.3.15 AMFR 特异性 siRNA 筛选 .....	58
3.3.16 敲低 AMFR 对 VP2 蛋白及泛素化水平的影响 .....	58
3.3.17 口蹄疫病毒蛋白影响 RPL35 的核转位 .....	59

3.3.18 KPNA3 与 RPL35 的相互作用 .....	61
3.3.19 口蹄疫病毒蛋白降解 KPNA3 影响 RPL35 的核转位 .....	61
3.4 讨论 .....	62
3.5 小结 .....	64
第 4 章 STING1 抑制口蹄疫病毒复制机制研究 .....	65
4.1 引言 .....	65
4.2 材料与方法 .....	66
4.2.1 细胞与病毒 .....	66
4.2.2 试剂和抗体 .....	66
4.2.3 质粒构建 .....	67
4.2.4 溶液的配制 .....	67
4.2.5 主要实验仪器 .....	68
4.2.6 细胞传代培养 .....	68
4.2.7 细胞转染 .....	68
4.2.8 免疫共沉淀试验 (Co-IP) .....	68
4.2.9 Western blotting .....	68
4.2.10 激光共聚焦试验 .....	68
4.2.11 蛋白酶体、溶酶体和凋亡通路抑制剂试验 .....	68
4.2.12 RNA 的提取 .....	68
4.2.13 RT-qPCR .....	68
4.2.14 RNA 干扰试验 .....	68
4.2.15 病毒滴度测定 .....	69
4.2.16 动物实验 .....	69
4.2.17 组织病理学评估 .....	69
4.2.18 统计学分析 .....	70
4.3 结果与分析 .....	70
4.3.1 STING1 以不依赖干扰素的方式抑制 FMDV 复制 (IBRS-2 细胞) ...	70
4.3.2 STING1 以不依赖干扰素的方式抑制 FMDV 复制 (BHK-21 细胞) ...	71
4.3.3 STING1 特异性 siRNA 筛选 (BHK-21 细胞) .....	71
4.3.4 敲低 STING1 对口蹄疫病毒复制的影响 (BHK-21 细胞) .....	72
4.3.5 STING1 特异性 siRNA 筛选 (IBRS-2 细胞) .....	73
4.3.6 敲低 STING1 对口蹄疫病毒复制的影响 (IBRS-2 细胞) .....	74
4.3.7 IRF3 敲除细胞系的构建 .....	75
4.3.8 敲除 IRF3 对 STING1 介导的 FMDV 复制抑制的影响 .....	76

4.3.9	敲低 TBK1 对 STING1 介导的 FMDV 复制抑制的影响 .....	77
4.3.10	敲低 IFNAR1 对 STING1 介导的 FMDV 复制抑制的影响 .....	78
4.3.11	敲低 PERK 对 STING1 介导的 FMDV 复制抑制的影响 .....	79
4.3.12	STING1 稳定剂 SB24011 对 FMDV 感染的抗病毒效力评价 .....	80
4.3.13	STING1 稳定剂 SB24011 不影响 FMDV 吸附和内化 .....	82
4.3.14	STING1 稳定剂 SB24011 抑制 FMDV 翻译和复制 .....	83
4.3.15	SB24011 对 SVA 的抗病毒活性 .....	84
4.3.16	SB24011 对 EV71 的抗病毒活性 .....	85
4.3.17	SB24011 对 EMCV 的抗病毒活性 .....	86
4.3.18	STING1 稳定剂 SB24011 在小鼠模型中证实 FMDV 的致病作用 ....	86
4.4	讨论 .....	87
4.5	小结 .....	89
第 5 章	口蹄疫病毒拮抗 STING1 的抗病毒作用 .....	90
5.1	引言 .....	90
5.2	材料与方法 .....	91
5.2.1	细胞与病毒 .....	91
5.2.2	试剂和抗体 .....	91
5.2.3	质粒构建 .....	92
5.2.4	溶液的配制 .....	93
5.2.5	主要实验仪器 .....	93
5.2.6	细胞传代培养 .....	93
5.2.7	细胞转染 .....	93
5.2.8	免疫共沉淀试验 (Co-IP) .....	93
5.2.9	Western blotting .....	93
5.2.10	激光共聚焦试验 .....	93
5.2.11	蛋白酶体、溶酶体和凋亡通路抑制剂试验 .....	93
5.2.12	RNA 的提取 .....	93
5.2.13	RT-qPCR .....	93
5.2.14	病毒滴度测定 .....	94
5.2.15	统计学分析 .....	94
5.3	结果与分析 .....	94
5.3.1	口蹄疫病毒感染抑制 STING1 蛋白的表达 .....	94
5.3.2	筛选在蛋白水平下调 STING1 的病毒蛋白 .....	96
5.3.3	病毒蛋白 3C 和 2B 剂量依赖性的降解 STING1 蛋白 .....	96

5.3.4 FMDV 3C 和 2B 降解 STING1 的通路鉴定 .....	98
5.3.5 细胞活力的检测 .....	100
5.3.6 病毒蛋白 3C 和 2B 对 STING1 mRNA 水平的影响 .....	100
5.3.7 STING1 与 3C 的互作研究 .....	101
5.3.8 FMDV 3C 蛋白酶活性在 STING1 降解中的作用 .....	103
5.3.9 其他小 RNA 病毒 3C 蛋白对 STING1 的降解作用 .....	103
5.3.10 小 RNA 病毒科 3C 氨基酸序列分析 .....	104
5.3.11 结构预测小 RNA 病毒科 3C 与 STING1 的间差异 .....	105
5.4 讨论 .....	107
5.5 小结 .....	109
第 6 章 结论与展望 .....	110
6.1 结论 .....	110
6.2 创新点 .....	110
6.3 展望 .....	110
参考文献 .....	112
附录 .....	135
致谢 .....	140
作者简介 .....	141
导师评阅表 .....	142