

研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2026-067

诺如病毒多功能蛋白 NS3 用于人工细胞物质交换模块的构建

孙雪倩^{1,2}, 尚坤², 李明¹, 杨晨光^{1,3}, 陆颖¹

(¹ 中国科学院物理研究所, 北京 100190; ² 延安大学延安医学院, 陕西 延安 716000; ³ 天津医科大学肿瘤医院, 天津 300060)

摘要: 在自下而上构建人工细胞的研究中, 理性构建具备多重生物活性的功能模块, 是实现复杂类生命行为的重要基础。病毒多功能蛋白因其结构紧凑、功能多样, 具有作为人工细胞功能元件的应用潜力。本研究以诺如病毒多功能蛋白 NS3 为例, 利用无细胞蛋白质合成系统 (CFPS) 实现其体外合成, 并证实所得 NS3 同时保留 RNA 解旋酶活性和磷脂膜透化活性。进一步研究表明, Mg^{2+} 对 NS3 的两类功能具有差异性调控作用: Mg^{2+} 促进 NS3 介导的 RNA 解旋过程, 却显著抑制其诱导的脂质体透化活性。通过单分子荧光分析, 我们发现 Mg^{2+} 可诱导 NS3 由开放构象向紧凑构象转变, 并降低其在磷脂膜界面的插入深度, 从而削弱膜透化能力。最后, 我们利用 NS3 实现了对细胞尺寸巨型单层囊泡 (GUV) 的膜透化, 并观察到 Mg^{2+} 能够降低其对 GUV 的膜透化活性, 从概念验证层面初步表明了 NS3 作为人工细胞可控物质交换模块的应用潜力。本研究为探索病毒多功能蛋白在人工细胞功能模块构建中的应用提供了初步实验依据。

关键词: 人工细胞; 病毒多功能蛋白 NS3; 无细胞蛋白质合成; 单分子荧光技术; Mg^{2+} 调控

中图分类号: Q789; Q939.4 **文献标志码:** A

Construction of artificial cell material exchange module using norovirus multifunctional protein NS3

SUN Xueqian^{1,2}, SHANG Kun², LI Ming¹, YANG Chenguang^{1,3}, LU Ying¹

(¹Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; ²Yan'an Medical College, Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, China; ³Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China)

Abstract: In bottom-up artificial cell construction, building life-like functions such as material exchange, information transmission, and environmental responsiveness from a limited set of molecular components is an important foundation toward more complex behaviors. Multifunctional viral proteins have undergone extensive evolution and often exhibit compact structures, diverse functions, and high conformational plasticity, making them promising components for

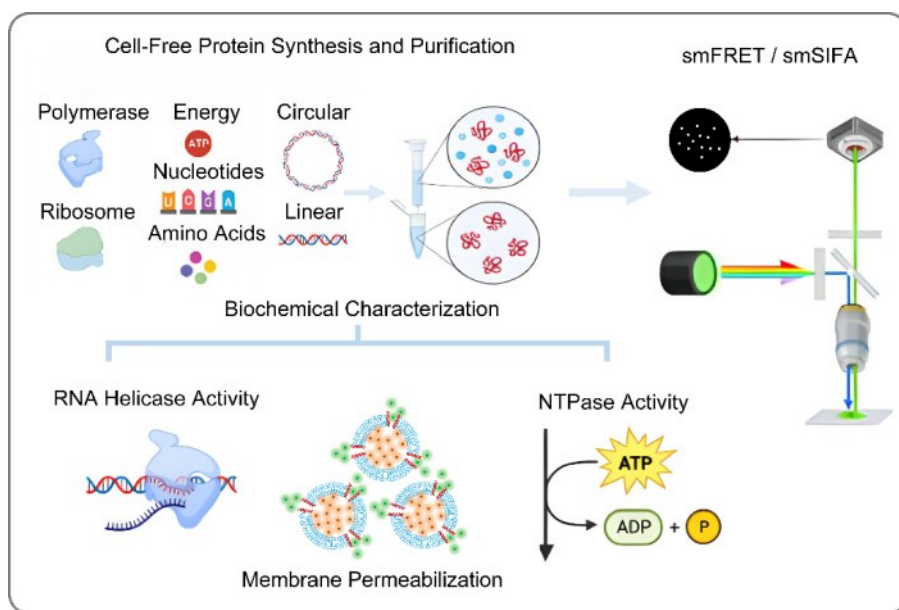
收稿日期: 2026-07-29 修回日期: 2026-10-12

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项 (XDB0480000); 国家重点研发计划 (2019YFA0709304); 国家自然科学基金 (T2221001, 32171228, 32471278)

引用本文: 孙雪倩, 尚坤, 李明, 杨晨光, 陆颖. 诺如病毒多功能蛋白 NS3 用于人工细胞物质交换模块的构建[J]. 合成生物学, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-067

Citation: SUN Xueqian, SHANG Kun, LI Ming, YANG Chenguang, LU Ying. Construction of artificial cell material exchange module using norovirus multifunctional protein NS3[J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-067

multifunctional artificial cell modules. In this study, we investigated NS3, a multifunctional protein from human norovirus. NS3 was expressed *in vitro* using a cell-free protein synthesis (CFPS) system and purified by Ni-NTA affinity chromatography. SDS-PAGE and Western blot analyses confirmed that the CFPS system produced soluble NS3. The purified protein retained both NTPase and RNA helicase activities and also exhibited substantial phospholipid membrane-permeabilizing activity. Further experiments revealed that Mg^{2+} differentially regulates these functions: it promotes NS3-mediated RNA unwinding while markedly inhibiting NS3-induced liposome permeabilization. To examine this mechanism in greater detail, we combined single-molecule fluorescence resonance energy transfer (smFRET) with graphene oxide-based single-molecule surface-induced fluorescence attenuation (smSIFA). These measurements showed that Mg^{2+} induces a transition from a relatively open, extended NS3 conformation to a more compact one. Mg^{2+} also decreases the depth of NS3 insertion into the membrane without significantly changing its steady-state membrane adsorption density. Together, these findings suggest that conformational rearrangement and altered membrane insertion, rather than reduced membrane adsorption, may underlie the inhibitory effect of Mg^{2+} on NS3-mediated membrane permeabilization. Finally, we reconstituted this function in giant unilamellar vesicles (GUVs), which serve as cell-scale artificial membrane compartments. NS3 promoted the entry of CF into GUVs, whereas Mg^{2+} significantly reduced the proportion of GUVs permeabilized by NS3. These results further establish the membrane-permeabilizing function of NS3 and demonstrate that it can be regulated by Mg^{2+} in an artificial cell setting. Overall, NS3 combines membrane permeabilization with RNA helicase activity, and these functions can be differentially regulated by Mg^{2+} . This study provides preliminary experimental support for using NS3 as a controllable material-exchange module in artificial cells and offers a basis for exploring viral multifunctional proteins as components for artificial cell engineering.



Keywords: artificial cells; viral multifunctional protein NS3; cell-free protein synthesis; single-molecule fluorescence; Mg^{2+} regulation

合成生物学的重要目标之一，是通过自下而上的策略构建能够模拟甚至拓展天然细胞功能的

人工细胞系统^[1-4]。实现这一目标的关键，在于构建具有多重生物学功能且可精准调控的蛋白模块，

并进一步将其整合为能够执行复杂生命过程的人工细胞功能网络^[1, 4-5]。天然病毒非结构蛋白经过长期进化,普遍具有结构紧凑、功能多样和效率高等特点,因此可作为构建人工细胞功能模块的重要元件来源。其中,诺如病毒非结构蛋白 NS3 是一种典型的多功能蛋白。在病毒生命周期中,NS3 一方面作为 RNA 解旋酶催化双链 RNA 解旋,促进病毒基因组的复制与转录^[6-8];另一方面具有膜透化活性。在鼠诺如病毒模型中,Wang 等发现,诺如病毒 NS3 的 N 端含有与程序性坏死执行蛋白 MLKL 膜破坏结构域同源的四螺旋束结构域。全长 NS3 及其 N 端片段可结合线粒体膜脂质心磷脂,引起线粒体膜透化和线粒体功能障碍,并最终促进病毒颗粒释放^[9]。该膜透化过程具有一定的尺寸选择性,可能涉及 NS3 与膜脂结合、构象变化、膜插入及孔道样结构形成等步骤。该研究还发现,人源诺如病毒 NS3 的全长蛋白及 N 端片段也能够在细胞中过表达时诱导细胞死亡,提示人源 NS3 可能具有与鼠源 NS3 相似的膜活性基础。基于上述研究线索,本研究将人源 NS3 作为人工细胞物质交换模块的候选元件。相比基于 connexin-43、 α -hemolysin 和 MscL 等通道或成孔蛋白构建的物质交换元件^[10-12],NS3 同时具有膜透化活性和其他生化活性,可能为人工细胞中膜物质交换与内部生化过程的功能耦合提供新的可能。

然而,此类兼具多重活性的病毒蛋白在传统活细胞表达体系中的制备仍面临诸多挑战。常规蛋白表达通常需要经历菌体培养、诱导表达、细胞裂解及蛋白纯化等多个步骤,不仅周期较长,而且表达效率容易受到宿主细胞生理状态的影响。更重要的是,NS3 本身具有膜成孔活性,可能对宿主细胞产生毒性,引起细胞生长抑制、蛋白错误折叠及包涵体形成等问题^[13],从而降低可溶性活性蛋白的产率。无细胞蛋白质合成系统 (cell-free protein synthesis, CFPS) 为解决上述问题提供了新的策略。CFPS 无需依赖宿主细胞的生长与存活,可在数小时内完成目标蛋白的合成;同时,其开放式体外反应体系便于精确调控反应条件,并可通过优化理化环境、添加分子伴侣或脂质体等方式,提高难表达蛋白及细胞毒性蛋白的表达效率。凭借反应快速、体系开放及可编程调控等

优势,CFPS 已成为人工细胞构建领域的重要技术平台^[14-20]。

基于此,本研究利用 CFPS 体系实现了诺如病毒多功能蛋白 NS3 的体外合成,并系统评估其功能活性。结果表明,CFPS 合成的 NS3 同时保留了 RNA 解旋酶活性和膜透化活性。进一步研究发现, Mg^{2+} 对 NS3 的两种功能具有差异性调控作用:其能够促进 RNA 解旋活性,却显著抑制膜透化活性。结合单分子荧光技术,本研究进一步揭示了这一功能调控的分子机制。 Mg^{2+} 可诱导 NS3 由开放构象向紧凑构象转变,并降低其在磷脂膜界面的插入深度,从而削弱膜透化能力。最后,我们将 NS3 的膜透化功能应用于细胞尺度的巨型单层囊泡 (giant unilamellar vesicle, GUV),验证了其作为人工细胞可控物质交换模块的可行性。本研究不仅为病毒来源多功能蛋白的无细胞制备及功能开发提供了初步实验依据,也为人工细胞功能模块的理性设计与可控构建提供了新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验材料与试剂

本研究所涉及的核心试剂与耗材如下:

1.1.1 分子克隆与核酸试剂

KOD FX 高保真 DNA 聚合酶 (Toyobo); 双链 DNA 定量试剂盒 (Thermo Fisher Scientific); 荧光标记的双链 RNA 底物。

1.1.2 无细胞表达系统

无细胞酵母提取液及配套试剂盒 (上海康码生物科技有限公司)。

1.1.3 蛋白纯化与鉴定试剂

Ni-NTA 琼脂糖亲和层析填料 (Product of Germany QIAGEN); 100 $\times$ 蛋白酶抑制剂 (雅酶生物); 预制聚丙烯酰胺凝胶 (雅酶生物); 10 $\times$ TAE 电泳缓冲液 (上海生工生物工程有限公司)。

1.1.4 生化与化学试剂

Triton X-100 (上海生工生物工程有限公司)、磷脂 (Phospholipids) (Avanti Polar Lipids)、羧基荧光素 (Carboxyfluorescein, CF) (Thermo Fisher Scientific)、氧化石墨烯 (Graphene oxide), 抗

His 标签抗体 (Proteintech)。

1.1.5 固体支撑膜制备的6种磷脂组分

二油酰基磷脂酰丝氨酸钠 (DOPS), 1-棕榈酰-2-油酰磷脂酰甘油 (POPG), 心磷脂 Cardiolipin (CL), 1-棕榈酰基-2-油酰基磷脂酰胆碱 (POPC), 磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI), 1-棕榈酰基-2-油酰基磷脂酰乙醇胺 (POPE), 上述所用到的磷脂产品均购买于 Avanti Polar Lipids 公司。

1.1.6 实验耗材

载玻片与盖玻片 (Thermo Fisher Scientific); 脱盐柱 (Thermo Fisher Scientific)。

1.2 方法

1.2.1 表达质粒的构建和线性 DNA 模板的制备与定量

本研究所用 NS3 序列来源于人源诺如病毒 Norwalk virus, HuNoV GI.1, 对应序列登录号为 GenBank KF039736, NS3 蛋白长度约为 365 aa, 在 C 端融合 8×His 标签, 标签序列为 HHHHHHHH, 通过公司合成得到 pD2P-NS3-8×His 表达质粒。用于单分子荧光实验的 NS3 突变体在野生型 NS3 基础上构建, 包括 N 端 G1C 单点突变体以及 G1C/C240 双标记构建体。通过同源重组克隆技术, 将 NS3 基因片段插入到含有 T7 启动子的 pET 系列表达载体中。构建完成的重组质粒经 Sanger 测序验证序列无误后, 提取高纯度质粒作为后续 PCR 扩增线性 DNA 的模板, 用 KOD FX 高保真 DNA 聚合酶对重组环形质粒进行 PCR 扩增, 以获得线性化的 DNA 模板。之后用双链 DNA 定量试剂盒结合特异性荧光染料, 通过荧光光谱仪测定其发射光谱, 最后计算 PCR 反应混合液中线性双链 DNA 浓度, 为后续在无细胞表达提供定量模板基础。

1.2.2 目的蛋白的无细胞表达

目的蛋白采用无细胞酵母提取液体系进行表达。将定量后的线性 DNA 模板加入无细胞反应体系中, 使 DNA 模板终浓度为 30 ng/μL, 反应总体积为 1000 μL。反应体系按照试剂盒说明书配制, 充分混匀后置于恒温摇床中, 在 30 °C、100 r/min 条件下孵育 3.5 h, 以进行转录与翻译偶联反应。

反应结束后, 立即加入 100×蛋白酶抑制剂至 1×终浓度, 以减少体系内源性蛋白酶对目的蛋白的降解。随后, 将混合液置于 4 °C 离心机中, 以 15,000×g 离心 15 min, 收集含有可溶性 NS3 蛋白的上清液备用。

1.2.3 目的蛋白的亲纯化与鉴定

利用组氨酸标签 (His-tag) 与镍离子的特异性结合特性对目的蛋白进行亲和纯化^[21]。将收集到的上清液与预处理的 Ni-NTA 琼脂糖树脂混合, 置于 4 °C 垂直旋转仪上温和孵育 1 h, 使目的蛋白充分结合于填料上。孵育完成后, 依次使用含有 60 mM 和 80 mM 咪唑的洗杂缓冲液对树脂进行洗涤, 以去除非特异性结合的杂蛋白。最后用含 500 mM 咪唑的高浓度洗脱缓冲液将目的蛋白从树脂上洗脱。收集洗脱液并进行超滤浓缩及缓冲液置换。最终, 取适量浓缩后的蛋白样品, 通过 SDS-PAGE 进行电泳分析, 以鉴定目的蛋白的相对分子质量及纯度^[22]。

1.2.4 Western blot 免疫印迹鉴定

将纯化后的 NS3 蛋白样品加入 5×SDS 上样缓冲液, 于 95 °C 加热变性 10 min。样品经 SDS-PAGE 电泳分离后, 通过半干转膜系统转移至 NC 膜上。用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 缓冲液在室温下封闭 1 h, 随后加入抗 His 标签抗体 (1:1000 稀释) 并摇床孵育 0.5 h^[23]; 之后用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 最后使用化学发光成像系统进行曝光和图像采集。

1.2.5 囊泡泄漏实验

(1) 将 PC 和 CL 按照摩尔比 9:1 均匀混合于含氯仿和甲醇的有机溶剂中。

(2) 在通风柜中用氮气将磷脂的混合氯仿溶液吹干, 然后转移到真空塔中, 用真空泵抽真空 1 h 以上, 以去除多余的有机溶剂。

(3) 使用溶有 20 mM 5-(6)-羧基荧光素的 HEPES 缓冲液 (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4) 水合磷脂, 使得最终磷脂溶液的浓度为 1 mg/mL。

(4) 将磷脂混合溶液转移至离心管中, 在 37 °C 水浴锅和液氮中反复转移, 使磷脂混合溶液反复冻融 10 次。使用 100 nm 聚碳酸酯膜 (Nuclepore Track-Etch membrane, Whatman) 和迷

你挤出机 (Mini-Extruder, Avanti Polar Lipids) 反复挤压过滤溶液 21 次, 以获得大小均一的囊泡^[24-25]。

(5) 使用脱盐柱将囊泡外侧溶液替换成 HEPES 缓冲液 (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4), 并将未被包裹进 LUVs 的多余染料去除。最后将制备完成的脂质体溶液保存在 4 °C 冰箱待用。

(6) 实验时, 稀释脂质至终浓度 5 µg/mL, 荧光光度计激发波长设为 490 nm, 发射信号采集范围为 520 - 530 nm。加入蛋白样品前先记录背景荧光强度 I_0 。随后向比色皿中加入终浓度 40 nM 的 NS3 蛋白, 并每 30 s 采集一次荧光强度。Mg²⁺ 调控实验中, MgCl₂ 的终浓度为 5 mM。反应结束后, 加入 Triton X-100 至终浓度为 0.1%, 使脂质体完全裂解, 并记录完全释放后的荧光强度 I_T 。

1.2.6 囊泡泄漏实验中荧光素泄漏率的计算

囊泡中荧光素泄漏率的确定依赖下面的公式:

$$CF \text{ Leakage} = [(I_s - I_0) / (I_T - I_0)] \times 100\%$$

其中, CF 代指 5-(6)-羧基荧光素, I_s 为加入蛋白样品后测得的 5-(6)-羧基荧光素的荧光强度, I_0 为未加入蛋白样品时的背景荧光强度, I_T 为加入 0.1% 的 Triton X-100, 脂质体被完全裂解时, 5-(6)-羧基荧光素完全释放后的荧光强度^[26]。

1.2.7 NS3 蛋白 NTPase 活性的定量测定

本研究通过检测 NTP 水解过程中释放的无机磷酸 (Pi) 来评估纯化后 NS3 蛋白的 NTPase 活性。实验采用基于 MESG (2-氨基-6-巯基-7-甲基嘌呤核苷) 和 PNP (嘌呤核苷磷酸化酶) 的酶偶联比色法进行动力学测定^[27]。首先, 在微孔板中配制反应体系, 依次加入适量的超纯水、反应缓冲液、MESG、PNP 以及纯化后的无细胞表达 NS3 蛋白。以不含 NS3 蛋白的等体积反应液作为空白对照, 置于酶标仪中进行基线平衡与调零。之后向体系中加入 NTP 以启动水解反应。

反应启动后, 使用酶标仪在 360 nm 波长下进行动力学循环扫描, 记录体系吸光度 (A_{360}) 随时间的变化。用已知浓度梯度的标准无机磷酸盐溶液, 在相同条件下绘制磷酸盐标准曲线。通过将样品在特定时间点的吸光度变化值代入标准曲线, 计算反应体系中释放的无机磷酸盐绝对浓度, 进

而定量评估 NS3 蛋白的催化速率与 NTPase 活性。所有定量分析实验均包含三次独立重复, 最终数据以平均值±标准误差表示。

1.2.8 Native-PAGE

用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Native-PAGE) 结合荧光示踪技术验证镁离子对诺如病毒 NS3 蛋白解旋活性的影响。将荧光标记的 17 nt ssRNA 与互补 30 nt ssRNA 按 2:1 的摩尔比混合, 在 95 °C 加热 5 min, 随后以 1 °C/min 的速率缓慢降温至 25 °C, 并在 25 °C 保温 10 min, 以形成带有单链突出端的荧光 dsRNA 底物。在总体积为 40 µL 的体系中进行酶促反应。反应体系直接采用 NS3 蛋白的储存缓冲液作为基础反应 Buffer, 体系内包含 200 nM 荧光 dsRNA 底物、5 mM ATP 以及 300 nM NS3 和终浓度分别为 0、0.3、1、2、5 mM 的 Mg²⁺。加入纯化后的 NS3 蛋白后, 将混合物置于室温下孵育 30 min。

反应结束后, 向体系中加入以 50% 甘油水溶液配制的非变性上样缓冲液, 混合均匀以终止反应并准备电泳。将处理后的样品上样至 12% 的天然聚丙烯酰胺凝胶, 低温环境下以 100 V 恒压电泳分离 60 min。为了准确定位底物与产物的电泳迁移率, 同时设置了单独的荧光 17 nt ssRNA 以及未经 NS3 蛋白处理的退火 dsRNA 作为对照组单独上样。电泳结束后, 使用 BIO-RAD 凝胶成像分析系统对凝胶进行荧光扫描, 通过对比各泳道中双链 RNA 探针的解链程度, 定性与定量评估镁离子对诺如病毒 NS3 蛋白解旋活性的影响。

1.2.9 单分子荧光实验流程

1.2.9.1 荧光标记

用于 smFRET 实验的 NS3 构建体含两个特异性半胱氨酸标记位点, 分别为 N 端 G1C 和 C 端 C240, 其余内源性半胱氨酸均被突变为丙氨酸。纯化后的蛋白同时与供体染料 LD555 和受体染料 LD655 进行标记反应, 蛋白与 LD555 和 LD655 的摩尔比分别为 1:3 和 1:5。标记反应在 4 °C 条件下过夜进行。反应结束后, 通过脱盐柱去除游离染料, 并利用吸收光谱测定蛋白浓度和染料标记效率。LD555 和 LD655 的标记效率分别为 88% 和 93%。用于 smSIFA 实验的 NS3 构建体仅含 N 端 G1C 单一半胱氨酸标记位点, 采用 LD555 进行

标记, 其标记效率为 84%。

1.2.9.2 固体支撑膜的制备

固体支撑模拟生物膜 (supported lipid bilayer, SLB) 被广泛用于在体外模拟体内的脂质环境。本研究采用囊泡破裂法在氧化石墨烯的基底上生长出磷脂双分子层^[28], 以模拟 NS3 能够正常行使功能的脂膜环境。

(1) 将购买的粉末状磷脂组分溶解在氯仿中, 并储存在 -80 °C 的冰箱中。制备固体支撑膜时, 将 POPC, DOPS, POPE, PI, CL 和 POPG, 一共 6 种磷脂组分按照摩尔比 35:20:20:10:5:10 混合在一个玻璃小瓶中, 最后加入甲醇使得氯仿和甲醇的体积比为 2:1。

(2) 在通风柜中用适当流速的氮气将溶剂氯仿和甲醇吹干。吹干溶剂的过程中, 旋转玻璃小瓶瓶身, 使得混合的磷脂溶液在瓶身上形成一层均匀且厚度较薄的油膜, 然后转移到真空塔中, 用真空泵抽真空 1 h 以上, 以去除多余的有机溶剂。

(3) 用一定量的 HEPES 缓冲液 (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4) 重悬玻璃瓶身上磷脂形成的油膜, 至磷脂溶液终浓度 2 mg/mL。在涡旋仪上涡旋 1 min, 以使磷脂的油膜完全溶解在 HEPES 缓冲液中, 此时的磷脂溶液呈白色乳浊状。

(4) 将磷脂溶液水浴超声直到磷脂溶液由白色乳浊状变为清澈透明状, 保存在 4 °C 冰箱中留用, 保存时间不宜超过一周, 否则可能会影响固体支撑膜的质量。

(5) 实验时将 120 μ L 磷脂溶液注入样品槽中, 然后将样品槽置于 37 °C 中的恒温箱过夜孵育。最后用 HEPES 缓冲液 (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4) 将多余的磷脂溶液冲洗干净。

1.2.9.3 玻片表面沉积单层氧化石墨烯

利用 Langmuir-Blodgett (LB) 膜技术在盖玻片表面沉积了一层氧化石墨烯薄膜。用于沉积氧化石墨烯薄膜的氧化石墨烯溶液是本研究课题组利用改进的 Hummers 方法制备得到的^[29]。

(1) 盖玻片首先按照丙酮, 甲醇以及食人鱼洗液的顺序处理完毕, 二次去离子水冲洗干净, 氮气吹干。

(2) 使用氯仿和二次去离子水依次清洗 LB 膜仪的水槽和滑障, 并且用氮气吹干后, 使用二次去离子水将水槽注满。

(3) 使用电机将盖玻片垂直下降至玻片下沿接触水槽液面, 将此时位置设置为零点。继续下降 50 mm 至盖玻片大部分浸入到水槽的液面之下。

(4) 用微量进样器向水槽的二次去离子水表层缓慢注入氧化石墨烯溶液 (溶于甲醇与二次去离子水混合液), 速率为 100 μ L/min, 注入 8-12 mL。

(5) 使用电机压缩滑障以获得氧化石墨烯薄膜, 压缩速度设为 20 cm²/min。

(6) 将浸入水槽的盖玻片以 1 mm/min 的速度缓慢拉至水槽的液面之上, 期间利用滑障的压缩维持恒定的表面压力。

(7) 将表面沉积了氧化石墨烯的盖玻片转移到烘箱中, 在 85 °C 的真空条件下干燥 2 h, 使氧化石墨烯薄膜牢固结合在盖玻片表面, 以构建后续 smSIFA 测量所需的二维淬灭基底^[30-32]。

1.2.9.4 单分子荧光数据处理

smFRET 和 smSIFA 数据根据信噪比和信号持续时间进行筛选, 筛选后的单分子轨迹采用隐马尔可夫模型进行状态拟合。smFRET 中供体与受体之间的距离根据 Förster 关系式 $R=R_0[(1-E)/E]^{1/6}$ 进行标定, 其中 E 为 FRET 效率, R_0 为 LD555-LD655 荧光对的 Förster 特征距离, 其值为 6.2 nm。smSIFA 中荧光分子至氧化石墨烯表面的垂直距离根据 $d=d_0[F/(F_0-F)]^{1/4}$ 进行标定, 其中 F 为氧化石墨烯基底上的荧光强度, F_0 为无氧化石墨烯淬灭条件下的参考荧光强度, d_0 为特征淬灭距离, 其值为 4.3 nm。

1.2.10 反向乳化法制备 GUV 及 CF 内流实验

本研究采用反向乳化法制备巨型单层囊泡 (GUVs), 该方法通过使水包油乳液液滴穿过预先形成的脂质单层界面, 获得具有脂质双层边界的细胞尺寸囊泡用于检测 NS3 蛋白在细胞尺寸人工膜区室中的膜透化能力^[33-34]。GUV 膜脂质组成为 PC:CL=9:1, 并加入少量 Rho-PE 用于膜荧光标记。脂质首先溶解于氯仿中, 随后加入 200 号工业白油, 使油相中总脂质浓度为 10 mM, 氯仿终体积为 10%。脂质油相充分混匀后, 于 55 °C 加热 10 min 以去除气泡并促进脂质均一分散。

GUV 形成效率受内外水相与油相之间的密度差、脂质浓度、乳滴体积、温度以及离心速度和离心时间等参数影响,因此本研究采用分阶段提高离心力的程序化离心方式促进乳滴穿过脂质单层界面^[34]。GUV 内水相为 220 mM 蔗糖溶液,外水相为 200 mM 葡萄糖溶液。将 10 μ L 内水相加入 300 μ L 脂质-油相中,经短暂振荡或刮板乳化形成水包油乳液。随后将乳液轻柔加入预先形成的水-油界面上方,并在室温下依次进行 250 $\times$ g 离心 5 min; 500 $\times$ g 离心 10 min; 1000 $\times$ g 离心 5 min 和 1500 $\times$ g 离心 2 min 的程序化离心,使乳液液滴通过脂质单层界面形成 GUV。离心结束后收集底部 GUV 样品用于后续实验^[35-38]。

为检测 Mg^{2+} 对诺如病毒 NS3 蛋白介导的 GUV 膜透化作用的影响,本研究采用羧基荧光素 CF 内流实验。将制备好的 GUV 加入 NS3 Buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) 中,实验设置空白对照组 (GUV only)、NS3 组和 NS3+ Mg^{2+} 组三组。各组均加入相同体积的 GUV 和终浓度 5 μ M 的 CF。NS3 蛋白组加入 NS3 蛋白至终浓度约 500 nM, NS3 + Mg^{2+} 蛋白组在此基础上加入 Mg^{2+} 至终浓度 5 mM。空白对照组不加入 NS3 蛋白和 Mg^{2+} ,并以 NS3 Buffer 补足至相同体积。 Mg^{2+} + NS3 蛋白组中,NS3 蛋白与 Mg^{2+} 先于室温预孵育 20 min,随后加入反应体系。所有样品轻轻混匀后,于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。孵育结束后,使用共聚焦荧光显微镜采集 Rho-PE 和 CF 通道图像。Rho-PE 信号用于确定 GUV 膜边界,CF 信号用于评估外源 CF 进入 GUV 内腔的程度。图像分析使用 Image J 完成^[39]。首先根据 Rho-PE 通道勾画单个 GUV 的膜边界,并在 CF 通道中测定囊泡内腔平均荧光强度。背景荧光由同一视野中无 GUV 区域测定并扣除。若某一 GUV 内腔 CF 平均荧光强度高于阴性

对照组平均值加 3 倍标准差,则判定为发生膜透化。

2.1 基于无细胞系统的高效表达、条件优化与纯化鉴定

为获得后续功能研究所需的 NS3 蛋白,本研究建立了基于 CFPS 的 NS3 表达与纯化流程 [图 1

(a)]。简单来说,首先构建 C 端融合 8 $\times$ His 标签的 NS3 表达模板,随后模板经 PCR 线性扩增与浓度定量后加入无细胞反应体系中进行表达,最终经 Ni-NTA 亲和层析进行纯化 [图 1(a)]。

SDS-PAGE 结果显示,洗杂组分 (Lanes 1 - 6) 中杂蛋白逐步减少,而纯化后的洗脱组分 (Lane 7) 在 NS3 预期分子量附近出现清晰主条带 [图 1(b)]。Western blot 进一步确认该条带可被抗 His 标签抗体识别 [图 1(c)]。上述结果表明,CFPS 体系能够绕开活细胞表达中 NS3 可能产生的毒性限制,并获得可用于后续功能实验的可溶性 NS3 蛋白。

2.2 NS3 蛋白多重生化活性的表征及 Mg^{2+} 的调控作用

获得纯化的 NS3 蛋白后,为表征其 NTPase 活性,本研究采用酶偶联比色法检测其催化 NTP 水解释放的 Pi [图 2(a)]。结果显示,随着 NS3 浓度升高,体系中的 Pi 释放量相应增加,表明无细胞体系制备的 NS3 保留了 NTPase 活性。本实验主要对 NS3 的 NTPase 活性进行验证,未进一步测定其酶促反应动力学参数。

获得纯化的 NS3 蛋白后,为表征其 NTPase 活性,本研究采用酶偶联比色法检测其催化 NTP 水解释放的 Pi。结果显示,随着 NS3 浓度升高,体系中的 Pi 释放量相应增加,表明无细胞体系制备的 NS3 保留了 NTPase 活性。本实验主要对 NS3 的 NTPase 活性进行验证,未进一步测定其酶促反应动力学参数。

为进一步验证 NS3 的 RNA 解旋活性,本研究设计并构建了荧光标记的双链 RNA 底物 [图 2(b)]。Native-PAGE 分析显示,在 Mg^{2+} 参与的反应体系中,NS3 能够催化双链 RNA 底物解链,并产生相应的单链 RNA 产物 [图 2(c)]。随着 Mg^{2+} 浓度升高,单链 RNA 产物比例逐渐增加;当 Mg^{2+} 浓度达到 2 mM 后,解旋效率趋于平台期,提示 NS3 介导的 RNA 解旋反应在该条件下接近饱和 [图 2(d)]。该结果表明,NS3 具有 Mg^{2+} 依赖性的 RNA 解旋活性。

此外,本研究采用羧基荧光素 (CF) 包封脂质体泄漏实验评估 NS3 的膜透化能力 [图 2(e)]。

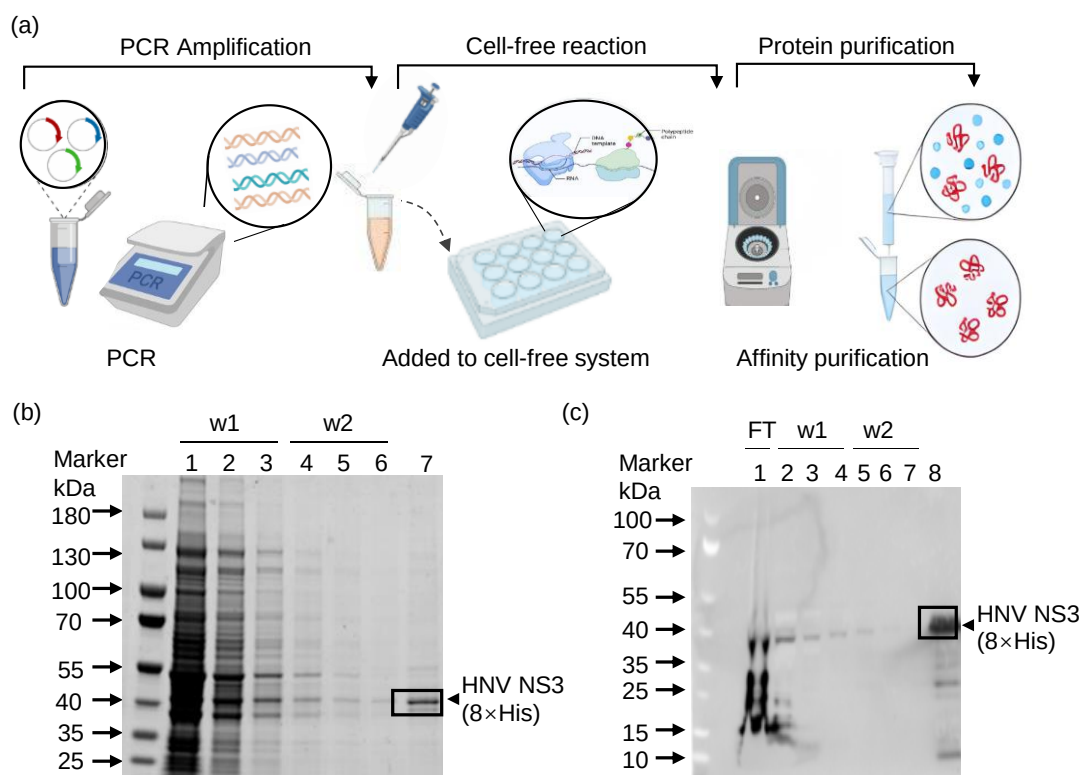


图1 人源诺如病毒NS3蛋白的无细胞表达与纯化

[(a) 基于无细胞蛋白质合成系统的NS3蛋白表达与纯化流程示意图；(b) NS3蛋白表达与纯化过程的 SDS-PAGE 分析 (Marker: 蛋白质分子量标准；Lane 1 - 3: 60 mM 咪唑洗杂组分；Lane 4 - 6: 80 mM 咪唑洗杂组分；Lane 7: 500 mM 咪唑洗脱获得的纯化 NS3 蛋白)；(c) 纯化产物的 Western blot 鉴定，泳道设置为 Lane1: 镍柱纯化流穿液；Lane 2 - 4: 60 mM 咪唑洗杂组分；Lane 5 - 7: 80 mM 咪唑洗杂组分；Lane 8: 500 mM 咪唑洗脱获得的纯化 NS3 蛋白]

Fig. 1 Cell-free expression and purification of human norovirus NS3 protein

[(a) Schematic diagram of NS3 expression and purification using a cell-free protein synthesis system and affinity chromatography; (b) SDS-PAGE analysis of NS3 expression and purification (Marker: protein molecular weight marker; Lanes 1 - 3, 60 mM imidazole wash fractions; Lanes 4 - 6, 80 mM imidazole wash fractions; Lane 7, purified NS3 eluted with 500 mM imidazole). (c) Western blot analysis of purified NS3. Marker, protein molecular weight marker; Lane 1: Flow-through from Ni-NTA column purification; Lanes 2 - 4, 60 mM imidazole wash fractions; Lanes 5 - 7, 80 mM imidazole wash fractions; Lane 8, purified NS3 eluted with 500 mM imidazole.]

结果显示，加入 NS3 后，脂质体内 CF 迅速释放，泄漏率随时间显著升高，并在约 50 min 时接近完全释放；相比之下，空白对照组几乎未发生 CF 泄漏 [图 2(f)]。值得注意的是，当反应体系中同时加入 Mg^{2+} 时，NS3 诱导的 CF 泄漏明显受到抑制，终点泄漏率降至约 50%。上述结果表明，NS3 保留了 RNA 解旋和膜透化活性；同时， Mg^{2+} 可促进其 RNA 解旋反应，同时抑制其膜透化活性，提示 NS3 具有作为可控人工细胞功能元件的潜力。

2.3 Mg^{2+} 对 NS3 的稳态膜表面吸附密度无明显影响

首先，我们探究了 Mg^{2+} 是否通过影响 NS3 在磷脂膜上的吸附能力来削弱其膜透化活性。我们

构建了模拟线粒体外膜组分的固体支撑膜，并以荧光标记 NS3 的膜表面密度表征其稳态吸附水平。NS3 与磷脂膜孵育 30 min 后进行单分子荧光成像，该孵育时间接近 LUV 泄漏反应达到平衡的时间窗口。结果显示，在 0、1 和 3 mM Mg^{2+} 条件下，脂质膜表面均可观察到面密度相当的 NS3 单分子荧光信号 [图 3(a-c)]。荧光信号面密度分析结果也显示，不同 Mg^{2+} 浓度下 NS3 的稳态膜表面吸附密度无明显差异 [图 3(d)]。虽然稳态膜表面吸附密度无法直接反映 NS3 与膜结合和解离的动力学过程，但上述结果表明，在接近 LUV 泄漏反应达到平衡的时间尺度下， Mg^{2+} 对 NS3 的稳态膜表面吸附密度无明显影响。因此， Mg^{2+} 对 NS3 膜透化活性的抑制可能并非主要由稳态膜吸附水平

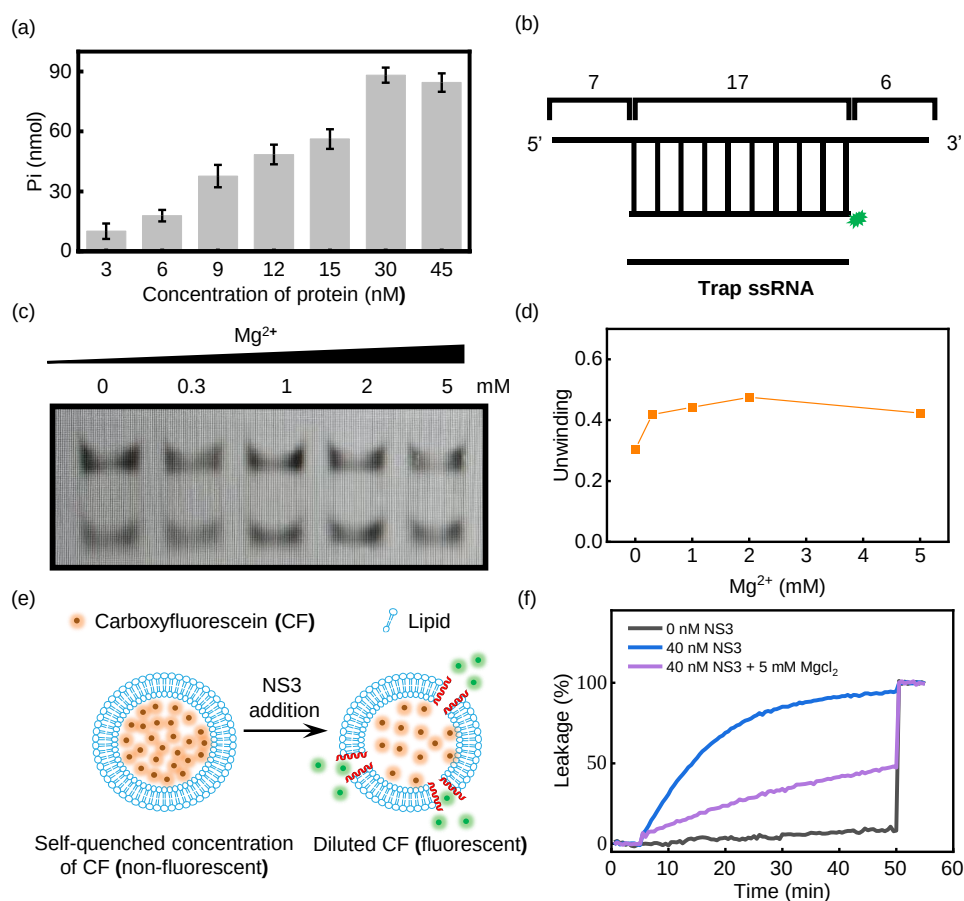


图2 人源诺如病毒 NS3 蛋白的膜透化能力及 Mg^{2+} 对其生化活性的影响

[(a) 不同浓度 NS3 蛋白的 NTPase 活性分析 (基于无机磷 Pi 释放量), 结果展示为 3 次重复实验的平均值 $\pm$ 标准误差; (b) NS3 蛋白作用的 RNA 双链底物示意图; (c) Mg^{2+} 对 NS3 解旋双链 RNA 活性的影响; (d) 不同 Mg^{2+} 浓度下解旋效率的定量分析。条带强度采用 GelAnalyzer 软件进行分析, 解旋效率表示为解旋产物条带强度占解旋产物与未解旋底物条带总强度的比例; (e) CF 脂质体膜透化检测示意图; (f) 40 nM NS3 诱导的脂质体 CF 泄漏动力学及 5 mM $MgCl_2$ 对其膜透化能力的抑制作用]

Fig. 2 Membrane permeabilization ability of human norovirus NS3 protein and the effect of Mg^{2+} on its biochemical activity

[(a) NTPase activity of NS3 at different concentrations. Data are shown as mean $\pm$ SEM from three independent experiments; (b) schematic of the RNA duplex substrate; (c) Mg^{2+} -dependent RNA duplex unwinding by NS3; (d) Quantitative analysis of helicase activity at different Mg^{2+} concentrations. Band intensities were quantified using GelAnalyzer, and the unwinding efficiency was calculated as the intensity of the unwound product band divided by the total intensity of the unwound product and intact substrate bands.; (e) Schematic diagram of the CF-liposome leakage assay. (f) CF leakage kinetics from liposomes induced by 40 nM NS3 and inhibited by 5 mM $MgCl_2$.]

降低引起, 而更可能与 NS3 结合膜后的构象变化或膜插入状态改变有关。

2.4 单分子 smFRET 探究 Mg^{2+} 对 NS3 分子内构象的动态调控

为解析 Mg^{2+} 对 NS3 构象动力学的调控作用, 本研究采用单分子荧光共振能量转移 (single-molecule fluorescence resonance energy transfer, smFRET) 技术, 表征其 N 端与 C 端结构域之间的相对空间距离及构象状态分布^[40-41]。鉴于目前尚

缺乏人源诺如病毒 NS3 的高分辨率实验结构, 本研究首先利用 AlphaFold 3 对其三维结构进行预测^[42]。预测模型显示, NS3 主要由 N 端膜活性结构域、C 端解旋酶结构域以及连接二者的连接区组成 [图 4(a)]。在不含 Mg^{2+} 和加入 Mg^{2+} 的条件下进行结构预测时, NS3 分别呈现两种不同的主要构型, 提示 Mg^{2+} 的结合可能改变 N 端与 C 端结构域之间的相对排列。

在无 Mg^{2+} 和有 Mg^{2+} 条件下, 两个候选荧光标记位点之间的预测距离分别约为 77 Å 和 43 Å, 提

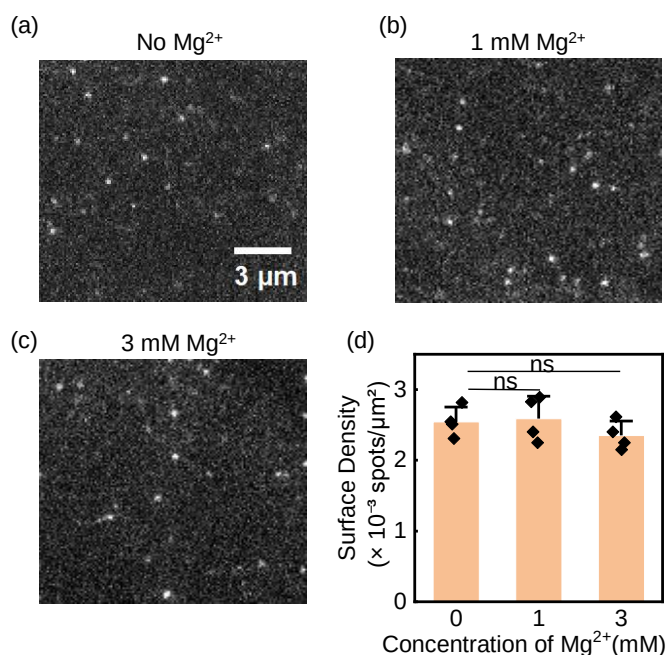


图3 Mg^{2+} 对人源诺如病毒 NS3 蛋白膜吸附能力的影响

[(a-c) 0、1 和 3 mM Mg^{2+} 条件下 NS3 蛋白在膜上吸附的单分子荧光成像图；(d) 三种 Mg^{2+} 浓度下 NS3 蛋白膜表面密度的统计分析，ns 表示无统计学差异性， $P \geq 0.05$ ，统计基于 4 次重复实验，每组不少于 6 个视野]

Fig. 3 Effect of magnesium ions on the membrane adsorption of human norovirus NS3 protein

[(a-c) Single-molecule fluorescence images showing NS3 adsorption on the membrane under 0, 1 and 3 mM Mg^{2+} ; (d) statistical analysis of the membrane surface density of NS3 at different Mg^{2+} concentrations, ns, not significant, $P \geq 0.05$, statistical analysis was based on four independent experiments, with no fewer than six fields of view analyzed per group.]

示 Mg^{2+} 可能引起 NS3 分子内结构域相对位置的显著变化。基于上述结构预测，分别在 NS3 的 N 端 G1 位点和 C 端 C240 位点引入荧光标记，通过 smFRET 效率变化表征两个结构域之间的相对距离及构象转换 [图 4(a,b)]。smFRET 实验在 NS3 与磷脂膜结合的状态下进行，即在玻片基底表面构建磷脂双分子层后加入荧光标记的 NS3，并采集其单分子 FRET 信号。实验结果显示，在 0 mM Mg^{2+} 条件下，单分子轨迹呈现低 FRET (~ 0.29) 和高 FRET (~ 0.88) 两种主要状态，并可观察到两种状态之间的动态跃迁。而 Mg^{2+} 浓度升高至 1 mM 后，高 FRET 状态的占比明显增加；当 Mg^{2+} 浓度进一步升高至 3 mM 时，FRET 效率分布主要集中于高 FRET 状态 [图 4(c)]。由于较高的 FRET 效率对应较短的供体—受体间距，上述结果表明， Mg^{2+} 可浓度依赖性地重塑 NS3 的构象能量景观，使其构象平衡由低 FRET、相对伸展的状态向高 FRET、相对紧凑的状态偏移。

2.5 smSIFA揭示 Mg^{2+} 诱导的NS3插膜深度变化

单分子 smFRET 结果表明， Mg^{2+} 可使 NS3 的构象平衡由低 FRET、相对开放状态向高 FRET、相对紧凑状态偏移。然而，这种分子内构象重排如何与膜透化活性的变化相关，仍有待进一步阐明。为解析 NS3 构象变化与膜插入行为之间的潜在联系，本研究采用单分子表面诱导荧光衰减技术 (single-molecule surface-induced fluorescence attenuation, smSIFA)，测定不同 Mg^{2+} 浓度下 NS3 在磷脂膜中的相对插入深度 [图 5(a)]。

smSIFA 的测量原理基于氧化石墨烯 (graphene oxide, GO) 对荧光分子的距离依赖性淬灭效应：荧光分子与 GO 表面的距离越近，其荧光淬灭程度越高。通过对荧光强度进行标定，可推算荧光标记位点相对于磷脂膜表面的轴向位置，进而表征蛋白质的相对插膜深度。为监测 NS3 N 端膜活性区域的膜界面行为，本研究在其 N 端 G1C 位点引入荧光标记，并记录该位点在支撑脂质双层中的

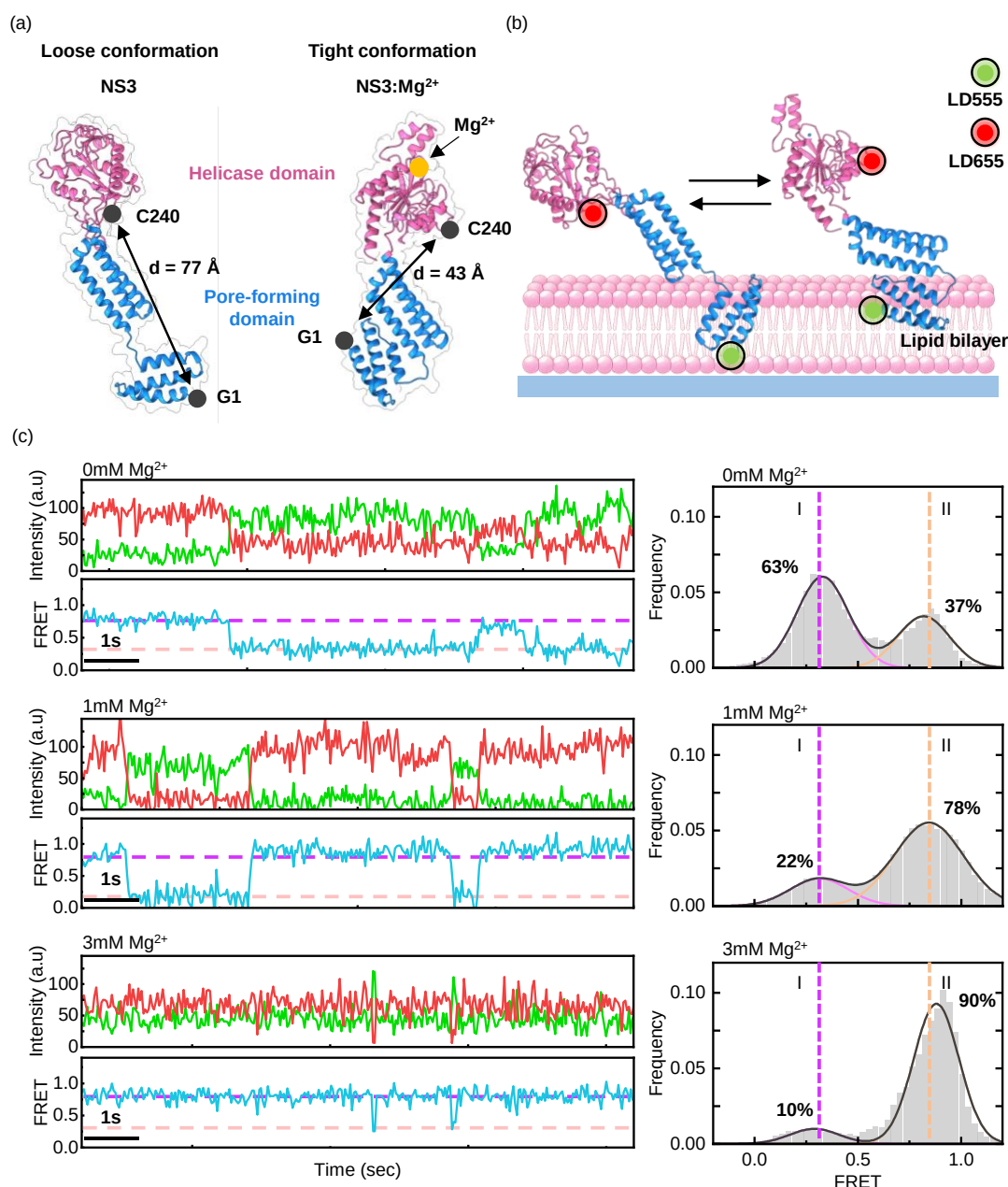


图4 不同浓度镁离子对人源诺如病毒NS3 蛋白构象影响的单分子 FRET 分析

[(a) NS3 蛋白构象预测及距离位点示意图; (b) Mg^{2+} 诱导的 NS3 蛋白构象转变及荧光标记示意图; (c) 0、1 和 3 mM Mg^{2+} 条件下的单分子 FRET 轨迹及对应 FRET 效率分布直方图]

Fig. 4 Single-molecule FRET analysis of the effect of different magnesium ion concentrations on the conformation of human norovirus NS3 protein

[(a) Predicted conformation of the NS3 protein and schematic illustration of selected distance sites; (b) schematic illustration of Mg^{2+} -induced conformational transition of the NS3 protein and fluorescence labeling strategy; (c) single-molecule FRET trajectories and corresponding FRET efficiency histograms under 0, 1, and 3 mM Mg^{2+}]

单分子荧光信号 [图 5(b)]。

实验中, 将荧光标记的 NS3 加入表面构建有支撑脂质双层的 GO 样品池, 分别在 0、1 和 3 mM Mg^{2+} 条件下采集单分子 smSIFA 轨迹 [图 5(c)]。

结果显示, NS3 主要呈现相对荧光强度约为 0.5 和 0.7 的两种状态。根据 smSIFA 距离标定结果, 两种状态分别对应约 2.8 nm 和 1.5 nm 的相对插膜深度。在 0 mM Mg^{2+} 条件下, NS3 主要分布于相对

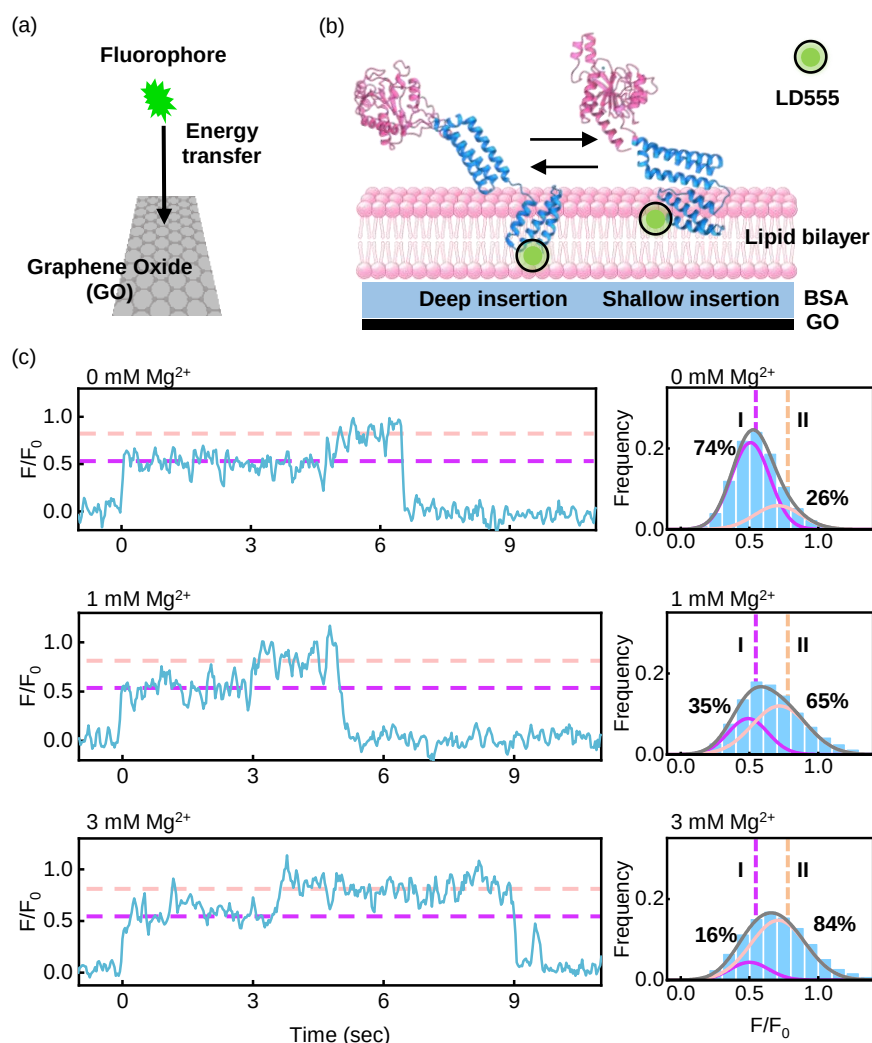


图5 Mg^{2+} 对人源诺如病毒NS3 蛋白插膜深度的影响

(a) 基于氧化石墨烯的 smSIFA 技术原理示意图；(b) NS3 蛋白在支撑脂质双分子层上的插膜状态示意图；(c) 0、1 和 3 mM Mg^{2+} 条件下 NS3 蛋白的单分子荧光强度轨迹及相对荧光强度分布直方图

Fig. 5 The effect of Mg^{2+} on the membrane insertion depth of human norovirus NS3 protein

(a) Schematic diagram of graphene oxide-based smSIFA; (b) schematic diagram of NS3 membrane insertion on the supported lipid bilayer; (c) single-molecule fluorescence intensity trajectories and relative fluorescence intensity histograms under 0, 1, and 3 mM Mg^{2+} .

荧光强度约为 0.5 的状态，对应较深的膜插入状态。加入 1 或 3 mM Mg^{2+} 后，荧光强度分布逐渐向约 0.7 的状态偏移；当 Mg^{2+} 浓度升高至 3 mM 时，该状态的占据概率增加至 84%。上述结果表明， Mg^{2+} 可浓度依赖性地改变 NS3 的膜插入状态分布，使其由较深插入状态向较浅插入状态偏移。

我们应用了 smFRET 与 smSIFA 两种技术，分别从分子内结构域相对距离和蛋白膜插入深度两个层面表征了 NS3 的构象状态。两种实验均检测到两个主要状态，且相应状态的占据概率随 Mg^{2+} 浓度升高呈现一致的变化趋势。综合上述结果，

我们认为 NS3 可能存在两种主要的整体构象状态：一种为分子内相对开放且插膜较深的状态，另一种为分子内相对紧凑且插膜较浅的状态。在较低 Mg^{2+} 浓度下，NS3 的构象平衡主要偏向分子内相对开放、插膜较深的状态；随着 Mg^{2+} 浓度升高，其构象平衡逐渐向分子内相对紧凑、插膜较浅的状态偏移，并伴随膜透化活性降低。因此， Mg^{2+} 可能通过“构象平衡重塑，膜插入变浅”的机制负向调控 NS3 的膜透化功能。这种构象调控的潜在结构基础可能与 Mg^{2+} 的结合位置及连接区的柔性有关。AlphaFold 3 结构预测显示， Mg^{2+} 可能结

合于 NS3 的 C 端 NTPase 和 RNA 解旋酶结构域, 而连接 N 端膜活性区域与 C 端结构域的连接区预测置信度较低, 提示该区域可能具有较高的构象柔性。基于上述结构特征, 我们推测, Mg^{2+} 结合引起的 C 端结构域局部构象变化可能通过柔性连接区传递, 改变 N 端与 C 端结构域之间的相对排列; 在 N 端与磷脂膜结合的约束下, 这种结构域间的相对运动可能进一步影响 NS3 在膜界面的整体构象及膜插入状态。

2.6 NS3 在细胞尺寸 GUV 区室中的膜透化功能重构与调控

在阐明 Mg^{2+} 调控 NS3 构象及膜插入行为的分子机制后, 本研究进一步在细胞尺度的膜区室中评价其作为人工细胞可控物质交换模块的功能可行。巨型单层囊泡 (giant unilamellar vesicle, GUV) 具有与天然细胞相近的尺寸和结构明确的脂质膜边界, 可提供相对独立且便于成像分析的内部区室, 因而被广泛用作人工细胞的模型体系^[43]。本研究采用反向乳化法制备 GUV, 膜组成为磷脂酰胆碱 (PC) 和心磷脂 (CL), 二者摩尔比为 9:1, 并掺入荧光磷脂 Rho-PE 以标记膜边界; 以羧基荧光素 (CF) 作为水溶性小分子示踪物, 评价 NS3 介导的跨膜物质转运 [图 6(a,b)]。

共聚焦荧光成像结果显示, 在未添加 NS3 的对照组中, 大多数 GUV 膜结构保持完整, 发生膜透化的 GUV 比例约为 ~10% [图 6(c,d)]。经 500 nM NS3 处理后, GUV 腔内可观察到明显的 CF 荧光信号, 发生膜透化的 GUV 比例升高至 ~58%, 表明外源 CF 能够跨越脂质膜进入囊泡内部。并且透化的 GUV 仍保持连续、闭合的膜荧光边界, 表明在本实验条件下, NS3 主要诱导 GUV 膜通透性增加, 而非造成囊泡破裂。同时加入 500 nM NS3 和 Mg^{2+} 后, 发生膜透化的 GUV 比例降低至 ~35% [图 6(c,d)], 说明 Mg^{2+} 能够抑制 NS3 在细胞尺度人工膜区室中的膜透化活性。上述结果与小尺寸脂质体泄漏实验中观察到的 NS3 介导的 CF 释放现象一致, 表明 NS3 可在不同尺度的脂质膜区室中促进水溶性小分子的跨膜交换, 并支持利用 Mg^{2+} 调控其膜透化功能的可行性。综上, NS3 能够在细胞尺度的人工膜区室中重构膜

透化功能, 支持其作为人工细胞物质交换模块的潜在应用价值。这一结果为进一步构建具有可控物质输入、代谢产物释放或区室间信号传递能力的人工细胞体系提供了初步实验依据。

3 总结与讨论

人工细胞研究的核心目标之一, 是利用有限且可控的分子元件重构物质交换、信息传递和环境响应等生命功能。病毒非结构蛋白在长期进化过程中形成了结构紧凑、功能多样和构象可塑性强等特征, 可作为人工细胞多功能元件的潜在来源。无细胞蛋白合成体系将蛋白质合成与宿主细胞生长相解耦, 能够规避病毒蛋白潜在细胞毒性及膜活性对表达过程的限制, 并为蛋白模块与人工膜区室的集成提供开放、可调的技术平台。基于此, 本研究以人源诺如病毒非结构蛋白 NS3 为对象, 利用无细胞系统实现其制备, 并对其进行了功能表征和人工膜区室中的功能重构。本研究是将病毒多功能蛋白作为人工细胞功能元件的一次概念验证性尝试, 旨在初步评估此类蛋白在人工细胞功能模块构建中的应用潜力。

本研究的结果在概念上初步验证了 NS3 作为人工细胞可控物质交换模块的可行性, 并利用单分子技术从构象层面初步解析了 Mg^{2+} 通过重塑 NS3 构象平衡调控其膜透化活性的机制。除此之外, 考虑到本研究所用磷脂膜含有带负电荷的脂质组分, Mg^{2+} 还可能通过屏蔽膜表面负电荷、改变膜表面电势以及影响蛋白-膜界面的相互作用状态等途径, 共同参与 NS3 膜透化活性的调控。因此, 与 connexin-43、 α -hemolysin 和 MscL 等已有的人工细胞通道或成孔蛋白元件相比, NS3 的潜在优势除了体现在其多种生化功能的耦合潜力, 还体现在 Mg^{2+} 对其膜透化活性的调控作用。这些特点提示, NS3 可能成为构建兼具物质交换、生化反应和环境响应能力的人工细胞功能模块的候选元件。未来, 我们将进一步评价 NS3 对不同离子及分子尺寸的选择性, 考察其膜透化过程的可逆性, 并通过分析不同 Mg^{2+} 浓度及其动态变化条件下的响应阈值、响应速度和状态转换行为, 评价其动态门控性能。

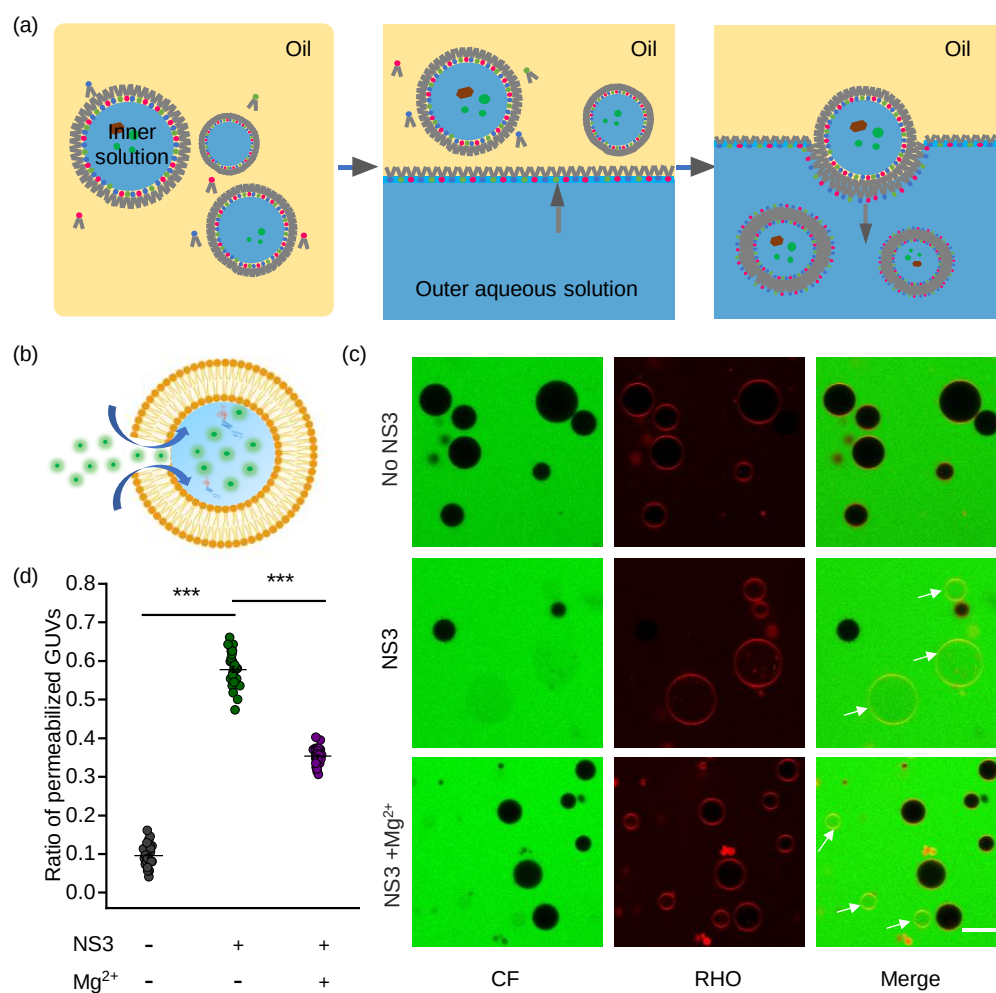


图6 NS3 诱导的 GUV 膜透化功能重构

[(a) 反向乳化法制备 GUV 的流程示意图；(b) NS3 透化人工细胞膜区室并介导 CF 染料内流的模式图；(c) 0 nM 和 500 nM NS3 及 500 nM NS3 + Mg^{2+} 处理后 GUV 的共聚焦显微镜图像，绿色代表 CF 荧光，红色代表 Rho-PE 标记的脂质膜，比例尺为 15 μm ；(d) 对应条件下 GUV 发生膜透化的比例，***P < 0.001。结果基于 30 次 Bootstrap 抽样，统计透化 GUV 占全部 GUV 的比例；每组 GUV 数量均大于 100 个。]

Fig. 6 Functional reconstitution of NS3-induced GUV membrane permeabilization

[(a) Schematic diagram of GUV preparation using the inverted emulsion method; (b) schematic illustration of NS3-mediated permeabilization of artificial membrane compartments and CF influx; (c) confocal microscopy images of GUVs treated with 0, 500 nM NS3 or 500 nM NS3 with Mg^{2+} . Green indicates CF fluorescence, and red indicates the Rho-PE-labeled lipid membrane. Scale bar = 15 μm ; (d) proportion of permeabilized GUVs under corresponding conditions, ***P < 0.001. The results are based on 30 bootstrap resamplings; the proportion of permeabilized GUVs among all GUVs was calculated, with more than 100 GUVs in each group.]

此外，本研究对病毒非结构蛋白的无细胞制备、单分子机制解析和人工细胞功能重构的研究路线进行了初步探索。该研究路线首先选取具有潜在功能的病毒非结构蛋白，利用无细胞体系实现蛋白的快速制备与功能评价；随后结合单分子荧光技术，在构象动力学和分子作用机制层面建立对蛋白功能及其调控规律的定量认识，并以此指导功能元件的筛选与理性改造；最终将经功能和机制验证的蛋白模块整合至人工膜区室，实现

特定人工细胞功能的理性构建。该研究路线为后续探索病毒多功能蛋白在人工细胞中的应用提供了参考。

需要指出的是，本研究的实验设计、生化表征及单分子机制分析主要针对病毒多功能蛋白的膜透化功能展开，所采用的研究路线和分析方法具有较强的功能针对性，不能直接适用于其他功能的表征与机制解析。未来需要根据不同目标功能的作用特点建立相应的表征方法和机制研究体

系, 从而进一步明确病毒多功能蛋白作为人工细胞功能元件的适用范围。综上, 本研究以人源诺如病毒 NS3 为代表, 初步验证了“病毒多功能蛋白挖掘-无细胞制备-单分子技术探索机制-人工细胞功能重构”这一技术路线的可行性, 为病毒来源多功能蛋白的无细胞系统开发及人工细胞功能模块的构建提供了一个新的研究思路。

参 考 文 献

- [1] IVANOV I, CASTELLANOS S L, BALASBAS S, et al. Bottom-Up Synthesis of Artificial Cells: Recent Highlights and Future Challenges[J]. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2021, 12(1): 287-308.
- [2] BUDDINGH' B C, VAN HEST J C M. Artificial Cells: Synthetic Compartments with Life-like Functionality and Adaptivity[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2017, 50(4): 769-777.
- [3] XU C, HU S, CHEN X. Artificial cells: from basic science to applications[J]. *Materials Today*, 2016, 19(9): 516-532.
- [4] JIANG W, WU Z, GAO Z, et al. Artificial Cells: Past, Present and Future[J]. *ACS Nano*, 2022, 16(10): 15705-15733.
- [5] BAILONI E, PARTIPILO M, COENRADIJ J, et al. Minimal Out-of-Equilibrium Metabolism for Synthetic Cells: A Membrane Perspective[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(4): 922-946.
- [6] LI T F, HOSMILLO M, SCHWANKE H, et al. Human Norovirus NS3 Has RNA Helicase and Chaperoning Activities [J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(5): e01606-17.
- [7] PFISTER T, WIMMER E. Polypeptide p41 of a Norwalk-Like Virus Is a Nucleic Acid-Independent Nucleoside Triphosphatase[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(4): 1611-1619.
- [8] CAMPILLAY-VÉLIZ C P, CARVAJAL J J, AVELLANEDA A M, et al. Human Norovirus Proteins: Implications in the Replicative Cycle, Pathogenesis, and the Host Immune Response[J]. *Frontiers in immunology*, 2020, 11: 961.
- [9] WANG G, ZHANG D, ORCHARD R C, et al. Norovirus MLKL-like protein initiates cell death to induce viral egress[J]. *Nature*, 2023, 616(7955): 152-158.
- [10] KAM Y, KIM D Y, KOO S K, et al. Transfer of second messengers through gap junction connexin 43 channels reconstituted in liposomes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1998, 1372(2): 384-388.
- [11] MAJUMDER S, GARAMELLA J, WANG Y L, et al. Cell-sized mechanosensitive and biosensing compartment programmed with DNA[J]. *Chemical Communications*, 2017, 53(53): 7349-7352.
- [12] NOIREAUX V, LIBCHABER A. A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101(51): 17669-17674.
- [13] KATZEN F, PETERSON T C, KUDLICKI W. Membrane protein expression: no cells required[J]. *Trends in Biotechnology*, 2009, 27(8): 455-460.
- [14] PEREZ J G, STARK J C, JEWETT M C. Cell-Free Synthetic Biology: Engineering Beyond the Cell[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2016, 8(12): a023853.
- [15] GREGORIO N E, LEVINE M Z, OZA J P. A User's Guide to Cell-Free Protein Synthesis[J]. *Methods and Protocols*, 2019, 2(1): 24.
- [16] YUE K, LI Y, CAO M, et al. Bottom-Up Synthetic Biology Using Cell-Free Protein Synthesis, vol. 185[M]//LU Y, JEWETT M C. *Cell-free Macromolecular Synthesis*. Cham: Springer Nature Switzerland, 2023: 1-20.
- [17] CHONG S. Overview of Cell-Free Protein Synthesis: Historic Landmarks, Commercial Systems, and Expanding Applications [J]. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2014, 108(1).
- [18] NOZAWA A, OGASAWARA T, MATSUNAGA S, et al. Production and partial purification of membrane proteins using a liposome-supplemented wheat cell-free translation system[J]. *BMC Biotechnology*, 2011, 11(1): 35.
- [19] LONG A R, O'BRIEN C C, ALDER N N. The Cell-Free Integration of a Polytopic Mitochondrial Membrane Protein into Liposomes Occurs Cotranslationally and in a Lipid-Dependent Manner[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(9): e46332.
- [20] MORITANI Y, NOMURA S M, MORITA I, et al. Direct integration of cell-free-synthesized connexin-43 into liposomes and hemichannel formation[J]. *The FEBS Journal*, 2010, 277(16): 3343-3352.
- [21] HOCHULI E, DÖBELI H, SCHACHER A. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues[J]. *Journal of Chromatography A*, 1987, 411: 177-184.
- [22] LAEMMLI U K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685.
- [23] TOWBIN H, STAEBELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979, 76(9): 4350-4354.
- [24] OLSON F, HUNT C A, SZOKA F C, et al. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1979, 557(1): 9-23.
- [25] HOPE M J, BALLY M B, WEBB G, et al. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and

- ability to maintain a membrane potential[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1985, 812(1): 55-65.
- [26] ENDRES J L, CHAUDHARI S S, ZHANG X, et al. The *Staphylococcus aureus* CidA and LrgA Proteins Are Functional Holins Involved in the Transport of By-Products of Carbohydrate Metabolism[J]. *mBio*, 2022, 13(1): e02827-21.
- [27] WEBB M R. A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89(11): 4884-4887.
- [28] HARDY G J, NAYAK R, ZAUSCHER S. Model cell membranes: Techniques to form complex biomimetic supported lipid bilayers via vesicle fusion[J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2013, 18(5): 448-458.
- [29] HUMMERS W S, OFFEMAN R E. Preparation of Graphitic Oxide[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1958, 80(6): 1339-1339.
- [30] LI Y, QIAN Z, MA L, et al. Single-molecule visualization of dynamic transitions of pore-forming peptides among multiple transmembrane positions[J]. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 12906.
- [31] MA L, LI Y, LI M, et al. Protein-membrane interactions investigated with surface-induced fluorescence attenuation[J]. *Chinese Physics B*, 2017, 26(12): 128708.
- [32] FAN Q K, YANG C G, HU S X, et al. Single-molecular surface-induced fluorescence attenuation based on thermal reduced graphene oxide[J]. *Acta Physica Sinica*, 2023, 72(14): 147801.
- [33] PAUTOT S, FRISKEN B J, WEITZ D A. Production of Unilamellar Vesicles Using an Inverted Emulsion[J]. *Langmuir*, 2003, 19(7): 2870-2879.
- [34] MOGA A, YANDRAPALLI N, DIMOVA R, et al. Optimization of the Inverted Emulsion Method for High-Yield Production of Biomimetic Giant Unilamellar Vesicles[J]. *ChemBioChem*, 2019, 20(20): 2674-2682.
- [35] YANDRAPALLI N, SEEMANN T, ROBINSON T. On-Chip Inverted Emulsion Method for Fast Giant Vesicle Production, Handling, and Analysis[J]. *Micromachines*, 2020, 11(3): 285.
- [36] LITSCHER T, SCHWILLE P. Protein Reconstitution Inside Giant Unilamellar Vesicles[J]. *Annual Review of Biophysics*, 2021, 50(1): 525-548.
- [37] GÖPFRICH K, PLATZMAN I, SPATZ J P. Mastering Complexity: Towards Bottom-up Construction of Multifunctional Eukaryotic Synthetic Cells[J]. *Trends in Biotechnology*, 2018, 36(9): 938-951.
- [38] GÖPFRICH K, HALLER B, STAUFER O, et al. One-Pot Assembly of Complex Giant Unilamellar Vesicle-Based Synthetic Cells[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(5): 937-947.
- [39] SCHNEIDER C A, RASBAND W S, ELICEIRI K W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 671-675.
- [40] HA T. Single-Molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer[J]. *Methods*, 2001, 25(1): 78-86.
- [41] ROY R, HOHNG S, HA T. A practical guide to single-molecule FRET[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(6): 507-516.
- [42] ABRAMSON J, ADLER J, DUNGER J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3[J]. *Nature*, 2024, 630(8016): 493-500.
- [43] TERASAWA H, NISHIMURA K, SUZUKI H, et al. Coupling of the fusion and budding of giant phospholipid vesicles containing macromolecules[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(16): 5942-5947.



通讯作者：陆颖(1981—)，女，研究员，博士生导师。研究方向为生物膜系统的复杂动力学；人工细胞膜的形变及运输。

E-mail: yinglu@iphy.ac.cn



通讯作者：杨晨光(1994—)，男，博士后，研究方向为单分子生物物理；膜成孔蛋白的动力学过程。

E-mail: yangchengguang@iphy.ac.cn



第一作者：孙雪倩(1999—)，女，硕士研究生。研究方向为病原生物学。

E-mail: sunxueqian2026@163.com

作者贡献声明：

陆颖、杨晨光：提出概念、基本框架、提出研究方向、设计论文框架；陆颖、李明、杨晨光、孙雪倩：设计研究思路、设计研究方案、研究方案可行性调查分析、实施研究过程；孙雪倩、杨晨光、尚坤：进行实验、进行对比实

验、实验分析;孙雪倩、尚坤:文献调研与整理;孙雪倩、杨晨光:确定研究对象范围、收集数据、采集、清洗与分析数据;孙雪倩、杨晨光:承担技术开发、绘制图谱;孙雪倩、杨晨光:参与撰写论文;孙雪倩、陆颖:起草论文、修订论文、审核论文;杨晨光、孙雪倩:参与论文修订、论文最终版本修订。所有作者均已阅读并同意文章的最终投稿版本。机构审查委员会声明:不适用。知情同意声明:不适用。数据可用性声明:如需实验数据,请联系通讯作者获取。

利益冲突:

没有利益冲突。