

國立臺灣大學生命科學院分子與細胞生物學研究所



碩士論文

Institute of Molecular and Cellular Biology

College of Life Science

National Taiwan University

master thesis

利用單分子螢光共振能量轉移技術探討 SARS-CoV-2

偽結的摺疊

Study of the folding of frameshift-stimulating

SARS-CoV-2 pseudoknot using single-molecule FRET

吳秉強

Ping-Chang Wu

指導教授：溫進德 博士

Advisor : Jin-Der Wen, Ph.D.

中華民國 111 年 8 月

August, 2022



國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書
MASTER'S THESIS ACCEPTANCE CERTIFICATE
NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

利用單分子螢光共振能量轉移技術探討 SARS-CoV-2 偽結的
摺疊

Study of the folding of frameshift-stimulating SARS-CoV-2
pseudoknot using single-molecule FRET

本論文係 吳秉強 (R09B43005) 在國立臺灣大學 分子與細胞生物學研究所 完成之碩士學位論文，於民國 111 年 7 月 29 日承下列考試委員
審查通過及口試及格，特此證明。

The undersigned, appointed by the Department / Institute of Molecular and Cellular Biology
on 29/07/2022 have examined a Master's thesis entitled above presented by Ping-Chang Wu
(R09B43005) candidate and hereby certify that it is worthy of acceptance.

口試委員 Oral examination committee:

溫建德 張力堯 余建泓
(指導教授 Advisor)

系主任/所長 Director: 董楷書

誌謝



首先最感謝的就是溫進德老師這兩年對於我的照顧，雖然這兩年剛好碰到了新冠病毒來襲耽誤了部分的實驗，然而，無論是我在實驗中遇到不同的瓶頸，又或者是資料分析時有著疑惑的觀點，老師都還是十分有耐心的與我討論並提供我十足的建議，最後在撰寫論文時老師所提供的意見與方向也給了我很大的幫助，只能說再次感謝老師了。另外，我還要感謝臆嵐學姊以及健州學長不厭其煩的為我們解決實驗上的問題，還要謝謝仁豪學長、韋霖學長、宜芳學姊、翊廷學姊在 FRET 實驗中對我的幫助，也謝謝大維學長與睿芸學姊在實驗的空檔陪我聊天打屁豐富了我的研究生生活。最後，感謝與我共同奮鬥兩年的好同學仕捷、祐農、廷莉，也祝福瑀彤、嫻妤、鈺婕、世綸、名巧、渝暄、郁涵未來實驗順利。

中文摘要

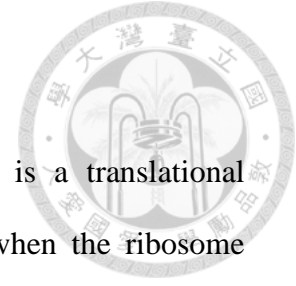


許多種類的病毒或細菌等擁有較短信使核糖核酸(mRNA)的物種會藉由核糖體重複讀取一個核苷酸，使下游核苷酸密碼子重新排列進而合成出不同的蛋白質，這種機制稱為-1 框架位移，而-1 框架位移發生的條件需要有滑動序列以及距離下游 5-7 個核苷酸的二級結構(例如偽結)。本次實驗我們使用 SARS-CoV-2 偽結 RNA 作為實驗材料，SARS-CoV-2 為一 RNA 病毒並且為 COVID-19 的感染源，值得注意的是 SARS-CoV-2 偽結 RNA 具典型冠狀病毒 RNA 的三莖三環結構，並有著 15-30%的-1 框架位移效率。

我們透過與互補 DNA 的黏合解開 SARS-CoV-2 偽結的二級結構，再將互補 DNA 由 3'端到 5'端的逐步與 RNA 分離以模擬核糖體在 mRNA 轉譯的過程，並透過單分子螢光共振能量轉移 (smFRET)技術測量 SARS-CoV-2 偽結於再摺疊過程中特定兩點的距離變化，以推斷其構型的改變及探討中間態形成與否與其對-1 框架位移效率的影響。我們分別使用 DNA polymerase I, Klenow Fragment、Exonuclease V (RecBCD)、phi29 DNA polymerase 進行 RNA/DNA 的分離，發現 Klenow fragment 無法成功將互補的 DNA 去除。而 Exonuclease V 能有效去除 DNA 並使 SARS-CoV-2 偽結重新摺疊，然而，由於 Exonuclease V 的作用是雙向並可能會造成 RNA 結構不穩定。而 SARS-CoV-2 RNA 在 phi29 DNA polymerase 作用下能明顯觀察出 RNA 逐步形成偽結的過程，並能觀察到部份 RNA 再摺疊的過程中有中間態短暫的形成，這些中間態是否會影響-1 框架位移效率目前尚不清楚，仍需要後續不同具框架位移機制的 RNA 互相比較。

關鍵字：-1 框架位移、SARS-CoV-2 偽結、單分子螢光共振能量轉移、DNA polymerase I, Klenow Fragment、Exonuclease V (RecBCD)、phi29 DNA polymerase

Abstract



Minus-one programmed ribosomal frameshifting (-1 PRF) is a translational mechanism in several types of viruses and bacteria. It occurs when the ribosome rereads a nucleotide and therefore changes the reading frame in order to express multiple proteins from a single mRNA. In order to stimulate -1 PRF, a slippery sequence and a well-spaced downstream RNA secondary structure, such as a pseudoknot, should be contained in mRNA. In this experiment, we used the frameshift-stimulating pseudoknot RNA derived from SARS-CoV-2, which is an RNA virus that causes COVID-19, as our model. It is noteworthy that the SARS-CoV-2 pseudoknot RNA is a traditional three stem-three loop pseudoknot structure and its -1 frameshift efficiency is about 15-30%.

We used single-molecule Förster resonance energy transfer (smFRET) to observe the folding of SARS-CoV-2 pseudoknot RNA. Native and intermediate conformations may be formed when RNA refolds during ribosomal translation. To simplify the experiment and mimic the ribosomal translation, we annealed SARS-CoV-2 pseudoknot RNA with its complementary DNA and then the RNA was released from the 5' to 3' end gradually by removing the DNA strand. DNA polymerase I Klenow Fragment, Exonuclease V (RecBCD), and phi29 DNA polymerase were used to release RNA. We found that DNA polymerase I Klenow Fragment isn't able to displace the RNA strand. Exonuclease V can digest the complementary DNA to release the pseudoknot RNA, but it acts bidirectionally, which can also digest from the opposite end of DNA. When treating with phi29 DNA polymerase, which has stronger strand displacement ability than the Klenow Fragment, transient intermediates can be observed during RNA refolding to pseudoknots. However, whether these

intermediates influence -1 PRF is still unknown and should be compared to other frameshift-stimulating RNA in the future.

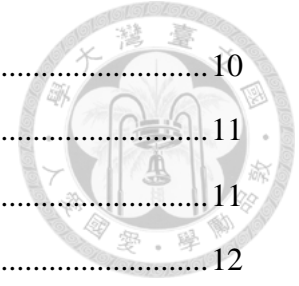


Keywords : Minus-one programmed ribosomal frameshifting (-1 PRF) 、 SARS-CoV-2 pseudoknot 、 smFRET 、 DNA polymerase I, Klenow Fragment 、 Exonuclease V (RecBCD) 、 phi29 DNA polymerase

目錄



口試委員審定書.....	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	iii
Abstract.....	iv
目錄.....	vi
圖目錄.....	viii
表目錄.....	x
一、導論.....	1
1.1 計畫性核糖體框架位移.....	1
1.2 嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒 2 型(SARS-CoV-2).....	1
1.3 單分子技術.....	2
1.3.1 簡介.....	2
1.3.2 單分子技術應用.....	3
1.3.3 螢光能量共振轉移 (Förster Resonance Energy Transfer, FRET)	3
1.4 酵素.....	4
1.4.1 Exonuclease V (RecBCD)	4
1.4.2 DNA polymerase I, Large(Klenow) Fragment	4
1.4.3 phi29 polymerase	4
1.5 研究動機.....	5
二、材料與方法.....	6
2.1 材料.....	6
2.1.1 溶液.....	6
2.1.2 藥品.....	8



2.1.3 Constructs	10
2.1.4 酶.....	11
2.1.5 Kits.....	11
2.1.6 序列.....	12
2.2 方法.....	15
三、結果.....	26
3.1 SARS-CoV-2 偽結 RNA 製備.....	26
3.1.1 CoV2-UTR.....	26
3.1.2 Dye labeling.....	27
3.1.3 SARS-CoV-2 full RNA.....	27
3.1.4 互補 ssDNA 製備.....	28
3.2 SARS-CoV-2 偽結的再摺疊.....	28
3.2.1 SARS-CoV-2 偽結 RNA.....	29
3.2.2 DNA polymerase I, Klenow Fragment.....	29
3.2.3 Exonuclease V (RecBCD).....	30
3.2.4 phi29 DNA polymerase.....	33
四、討論.....	35
參考資料.....	38

圖目錄



圖 1、核醣體轉譯過程中可能形成 intermediate 影響-1 PRF 效率	43
圖 2、SARS-CoV-2 full RNA construct	44
圖 3、HDV ribozyme 系統.....	45
圖 4、HDV 自切效率比較.....	46
圖 5、RNA-dye FPLC 純化	47
圖 6、SARS-CoV-2 接合產物.....	48
圖 7、CoV2 ssDNA 的製備	49
圖 8、SARS-CoV-2 偽結結構、FRET 值分布與 FRET 隨時間變化圖	51
圖 9、SARS-CoV-2/ DNA hybrid 結構、FRET 值分布與 FRET 隨時間變化圖 ...	52
圖 10、SARS-CoV-2 再摺疊實驗設計 (聚合酶).....	53
圖 11、SARS-CoV-2 再摺疊實驗設計 (外切酶).....	54
圖 12、經 Klenow Fragment + 0.2 mM dNTPs treatment SARS-CoV-2 RNA FRET 值 分布與 FRET 隨時間變化圖	55
圖 13、SARS-CoV-2 RNA 在 Exonuclease V 無 ATP 作用之 FRET 分布與隨時間變 化圖.....	56
圖 14、經 Exonuclease V + 1 mM ATP treatment SARS-CoV-2 RNA FRET 隨時間變 化圖.....	57
圖 15、在 Exonuclease V 與不同 ATP 濃度作用當下 SARS-CoV-2 RNA 不同構型 的比例.....	58
圖 16、在 Exonuclease V 與不同 ATP 濃度作用當下 SARS-CoV-2 RNA 動態轉換 速率比較.....	59
圖 17、在 Exonuclease V 與不同 ATP 濃度作用後 SARS-CoV-2 RNA 不同構型的 比例.....	61

圖 18、在 Exonuclease V 與不同 ATP 濃度作用後 SARS-CoV-2 RNA 動態轉換速率比較(無 enzyme 及 ATP)	62
圖 19、SARS-CoV-2 RNA 經 Exonuclease V 與不同 ATP 濃度作用並穩定後 FRET 分布圖.....	64
圖 20、SARS-CoV-2 RNA 在 phi29 DNA polymerase 無 dNTPs 作用之 FRET 分布與隨時間變化圖.....	65
圖 21、經 phi29 DNA polymerase + 0.2 mM dNTPs treatment SARS-CoV-2 RNA FRET 隨時間變化圖	66
圖 22、在 phi29 DNA polymerase 與 0.2 mM、0.5 mM dNTPs 濃度作用當下 SARS-CoV-2 RNA 不同構型的比例	68
圖 23、在 phi29 DNA polymerase 與 0.2 mM、0.5 mM dNTPs 濃度作用後 SARS-CoV-2 RNA 不同構型的比例	69
圖 24、SARS-CoV-2 RNA 經 phi29 DNA polymerase 與不同 dNTPs 濃度作用並穩定後 FRET 分布圖	70
圖 25、Exonuclease V 作用後動態變化結構的推測.....	71

表目錄



表 1、CoV2u-Cy3 與 CoV2d-Cy5 label 效率.....	72
表 2、SARS-CoV-2 RNA 在 Exonuclease V 與不同濃度 ATP 作用下各分子於各型態的比例.....	73
表 3a、SARS-CoV-2 RNA 在 Exonuclease V 與不同濃度 ATP 作用下各 state 的 FRET 值.....	73
表 3b、SARS-CoV-2 RNA 在 Exonuclease V 與不同濃度 ATP 作用下各 state 間的轉換速率 (1/s).....	73
表 4、SARS-CoV-2 RNA 在 Exonuclease V 與不同濃度 ATP 作用 15 分鐘並洗掉後各分子於各型態的比例.....	74
表 5a、SARS-CoV-2 RNA 在 Exonuclease V 與不同濃度 ATP 作用 15 分鐘並洗掉後各 state 的 FRET 值	74
表 5b、SARS-CoV-2 RNA 在 Exonuclease V 與不同濃度 ATP 作用 15 分鐘並洗掉後各 state 間的轉換速率 (1/s).....	74
表 6、SARS-CoV-2 RNA 在 phi29 DNA polymerase 與不同濃度 dNTPs 作用下各分子於各型態的比例.....	75
表 7、SARS-CoV-2 RNA 在 phi29 DNA polymerase 與不同濃度 dNTPs 作用 15 分鐘並洗掉後各分子於各型態的比例.....	75

一、導論



1.1 計畫性核糖體框架位移

在轉譯的過程中，核糖體以起始密碼子(AUG)開始每三個核苷酸做為一個密碼子沿著 mRNA 滑動並依照對應的閱讀框架序列轉譯出相應的胺基酸，然而在部分病毒或細菌中核糖體能在轉譯期間做出特定的滑動使 mRNA 閱讀框架改變，進而轉譯出不同的胺基酸 (Stahl, G et al. 2002)。這種使單一 mRNA 序列能產出多種不同的產物的機制稱為計畫性核糖體框架位移(Programmed ribosomal frameshifting, PRF)。

滑動序列 X-XXY-YYZ，其中 X 為任意相同鹼基、Y 代表 U 或 A、Z 則是非 G 的鹼基，與在滑動序列下游 5-9 核苷酸處促進 PRF 的二級結構，如莖環或偽結，為發生 -1 PRF 的必要條件 (Jacks, T et al. 1988, Napthine, S et al. 2017)。夏因-達爾加諾序列(Shine-Dalgarno sequence, SD sequence)、滑動序列以及二級結構的不同皆會一定程度上影響框架位移的效率 (Chen, J et al. 2014., Atkins, J. F et al. 2016)。

當 -1 PRF 發生時，閱讀框架由原先的 X-XXY-YYZ 變為 XXX-YYY-Z，此改變影響整個下游的閱讀框架，轉譯出胺基酸的不同進而導致不同的蛋白質被合成 (Chang, K. C 2012)。

1.2 嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒 2 型(SARS-CoV-2)

嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒 2 型 (SARS-CoV-2)，簡稱新冠病毒，於 2019 年 12 月在中國武漢首次被發現，並在 2020 年 1 月至今襲捲了全球。新冠病毒主要透過呼吸道飛沫或飛沫形成的氣凝膠經眼、口、鼻感染人體上呼吸道並造成發燒、乾咳、味覺喪失等臨床症狀，並有約 30-60% 感染者為類流感輕症甚至是無



症狀，更造成防疫上的困難。SARS-CoV-2 基因序列並與 SARS-CoV 及 MERS-CoV 為同屬乙型冠狀病毒屬，為具包膜的正鏈 RNA 病毒，僅會感染哺乳動物並多以蝙蝠為自然宿主。

由於 SARS-CoV-2 屬於 RNA 病毒，在病毒複製過程中容易發生錯誤並導致病毒變異，根據 Chaw, S. M et al.2020 計算，SARS-CoV-2 病毒每個月累積 6 個突變。世界衛生組織整理出 5 個高關注 SAR-CoV-2 變異株 (Variants of Concern, VOC)，包含傳播最廣的 Alpha、使疫苗保護力下降的 Beta、二次感染風險高的 Gamma、傳播力最高的 Delta 以及突變最多的 Omicron。

SARS-CoV-2 偽結與大部分病毒促進-1 PRF 的偽結不同，為 3 stem 3 loop，透過 X-ray 分析其結構與 SARS-CoV 偽結基本一致，並僅有 1 個核苷酸的差異，即在第三 loop 上 cytidine 置換為 adenosine，而兩者-1 PRF 效率均在 15-30%，透過改變序列以阻斷 stem 的形成會導致-1 PRF 效率降低 (Kelly, J. A et al. 2020., Neupane, K et al. 2021., Roman, C et al. 2021)。

1.3 單分子技術

1.3.1 簡介

分生實驗主要為研究多個分子之間的相互作用，然而就如同動物實驗般，各個個體間有著個體差異，在觀察的同時往往會忽略掉個別分子反應中發生的獨立事件，這也是傳統分生實驗無法有效解決的。單分子技術的特色就在於對個別分子進行觀察，在極微量的樣品當中就能有效觀察到大量個別分子的狀態，並透過平均求出分子表現的特質。另外，單分子技術有著可以操控單一分子的好處，例如，一分子在蛋白質作用下構型的變化、亦或著是分子在不同受力的下展現的特質 (Bustamante, C. 2008)。



1.3.2 單分子技術應用

單分子技術依實驗方法能主要分為兩大類，第一類是利用螢光標記待測分子並觀測此分子構型改變或與其他分子間的化學作用，此方法包括螢光共振能量轉移技術(Förster Resonance Energy Transfer, FRET)、全反射螢光顯微鏡(Total Internal Reflection Fluorescence, TIRF)以及共軛焦顯微鏡(confocal fluorescence microscope);另一類則為透過對分子施加外力觀察分子的變化，包括光鉗(optical tweezers)、磁鉗(magnetic tweezers)及原子力顯微鏡(atomic force microscope)。

1.3.3 螢光能量共振轉移 (Förster Resonance Energy Transfer, FRET)

螢光能量共振轉移為兩吸收光波長不重疊之分子發生能量轉移的現象。當供體螢光分子的放射光波長與受體螢光分子的吸收光波長重疊且兩分子間距離小於 10 nm 時，供體螢光分子所發出的螢光會相較其單獨存在時降低，稱螢光淬滅(Quenching)，能量會轉移給受體螢光分子，使受體分子放射出螢光，稱作敏化螢光(sensitized fluorescence)，此供體與受體間的 FRET 效率能根據 $E=1/[1+(R/R_0)^6]$ 計算，其中 R 代表供體與受體間的距離， R_0 表示 FRET 效率為 50% 之距離 (Ray, P. C et al. 2014., Arai, Y & Nagai, T. 2013., Piston, D. W & Kremers, G.-J. 2007)。

FRET 近年來被廣泛作為光譜尺來測量距離，其可以追蹤蛋白質間的相互作用或是單一蛋白質不同結構域的距離變化、觀測細胞膜與膜蛋白間的作用、研究細胞訊息傳遞的過程等一系列生化實驗 (Matsumoto, S & Hammes, G. G. 1975., Merchant, K. A et al. 2007., Truong, K & Ikura, M. 2001., Wu, Y et al. 2004)。作為偵測 FRET 的螢光分子主要分為三類，第一類是小分子有機染劑，如 Cy3、Cy5 等分子；第二類為螢光蛋白 (fluorescent protein, FPs)，如從水母體內純化出來的綠色螢光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP)；最後一類是量子點 (Quantum Dot,

QDs)。其中，螢光蛋白因可被藉由基因工程技術直接融合進欲觀察之生物細胞因而被運用於細胞型態的觀察；而小分子有機染劑及量子點主要是透過染劑標註在欲偵測分子上的抗體以觀測分子 (Periasamy, A. 2001., Bajar, B. T. 2016)。



1.4 酵素

1.4.1 Exonuclease V (RecBCD)


Exonuclease V 由同時為 3'-5' 解旋酶及核酸酶的 RecB、辨識 Chi Site 的 RecC、5'-3' 解旋酶 RecD 三個亞基所組成，故亦稱 RecBCD，它是大腸桿菌體內進行 DNA 同源重組 (homologous recombination) 以修復 DNA 受損、維持細胞存活的蛋白質 (Amundsen, S. K et al. 1986)。Exonuclease V 同時具備 3'-5' 及 5'-3' dsDNA 外切酶及 ssDNA 內切酶功能，而其作用效率深受 ATP 濃度 (Eichler, D. C & Lehman, I. R. 1977) 與二價陽離子濃度所調控，其中 Mg^{2+} 對於外切酶功能扮演著重要的角色 (Dillingham, M. S & Kowalczykowski, S. C. 2008)；反之若 Ca^{2+} 參與反應則會抑制外切酶能力，使 RecBCD 僅擁有解旋酶活性，不會水解 DNA (Rosamond, J et al. 1979)。

1.4.2 DNA polymerase I, Large (Klenow) Fragment

Large (Klenow) fragment 是 Klenow, H & Henningsen, I. 1970 透過 subtilisin 催化 DNA polymerase I 所分離出的片段之一，其同時具有 5'-3' 聚合酶及 3'-5' 外切酶的活性 (Jacobsen, H et al. 1974)。由於 Klenow fragment 的多工性，其可被運用於 DNA 定序 (Sanger, F et al. 1997)、cDNA 的合成 (Karkas, J. D. 1973)、補齊 5' overhang 並去除 3' overhang (Sambrook, J et al. 1989) 等分子實驗中。

1.4.3 Phi29 polymerase

Phi29 DNA polymerase 為一單體蛋白，來自於噬菌體 phi29 (Bacillus virus



phi29)中，由於其強大的 strand displacement 能力及高效率的聚合過程(Blanco, L et al. 1989)，進而大量被使用在分生實驗中的 multiple displacement amplification (MDA)。與 Klenow fragment 作用機制相似的是，其結構中包含了具聚合酶功能的 C-terminal domain 以及有著為了防止聚合錯誤進而導致錯配(mismatch)發生的 3'-5' 外切酶功能的 N-terminal domain (Garmendia, C et al. 1992; Bernad, A et al. 1990., Bernad, A et al. 1990)。

1.5 研究動機

-1 框架位移為核糖體在蛋白質轉譯過程中重複讀取一個核苷酸，此結果會造成核苷酸閱讀框架重新排列進而合成出不同的蛋白質，許多病毒及細菌會使用此機制來調控其利用單一訊息核糖核酸(mRNA)序列合成多種不同的蛋白質。而 -1 框架位移的發生條件為 mRNA 上游具有滑動序列以及滑動序列下游的 5-7 個核苷酸有核糖核酸的二級結構。

因核糖體在轉譯蛋白質的過程中會將 RNA 的二級結構解開，而 RNA 在後續重新摺疊的過程中可能會形成一些中間態 (圖 1)，根據先前研究，RNA 的二級結構會嚴重影響 -1 frameshifting 的效率。所以我們這裡要使用 smFRET 進行實驗，並以 SARS-CoV-2 偽結進行實驗，模擬核糖體經過 RNA 後 RNA 的再摺疊過程，分析是否在摺疊的過程有中間態的形成，並探討中間態對於 -1 框架位移的影響。

二、材料與方法



2.1 材料

2.1.1 溶液

【Dye coupling】

Chemicals	NaHCO ₃ (pH 8.5)	NH ₂ OH-HCl
Final Conc.	0.1 M	4 M

【HPLC】

Chemicals	Buffer A (Triethylammonium acetate, pH 7.0)	Buffer B (Acetonitrile)
Final Conc.	0.1M	100%

【Urea PAGE】

Chemicals	Urea	TBE buffer	Acrylamide	TEMED	APS
Final Conc.	7.6 M	1 x	10%	0.5 mM	0.08%

【5x Tris-Borate-EDTA buffer (TBE)】

Chemicals	Tris	Boric acid	EDTA (pH 8.0)
Final Conc.	0.44 M	0.44 M	10 mM



【Annealing buffer】

Chemicals	Formamide	PIPES-KOH (pH 6.4)	NaCl	EDTA* (pH 8.0)
Final Conc.	86.8%	0.04 M	86 mM	2 mM

【FRET buffer】

Klenow buffer (KLB)

Chemicals	Tris-HCl (pH 7.5)	MgCl ₂	KCl
Final Conc.	50 mM	10 mM	70 mM

phi29 buffer

Chemicals	Tris-HCl (pH 7.5)	MgCl ₂	KCl
Final Conc.	50 mM	10 mM	20 mM

Translation buffer (TLB)

Chemicals	HEPES-KOH (pH 7.5)	NH ₄ Cl	Mg(OAc) ₂
Final Conc.	40 mM	70 mM	10 mM

【Other smFRET buffer】

Trolox solution

Chemicals	FRET buffer	Trolox	β -ME
Final Conc.	1 x	1 mg/ml	3.6 mM

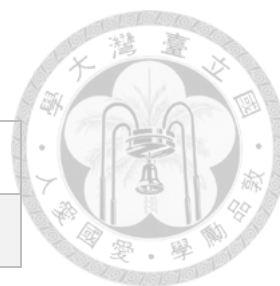


Image buffer

Chemicals	Trolox solution	PCA	PCD
Final Conc.	9/10 volume	2.5 mM	0.21 U/mL

NeutrAvidin mixture (NA)

Chemicals	NeutrAvidin	FRET buffer	β -ME
Final Conc.	0.2 mg/ml	1x	3.6 mM

2.1.2 藥品

物品	製造商	產品編號
10X TBE buffer (Tris-Borate-EDTA buffer)	Omics Bio	IB3251
2-Mercaptoethanol (β -ME)	SIGMA	M3148
50X TAE buffer (Tris-acetate-EDTA buffer)	Omics Bio	IB3211
Acetic acid (99.8%)	SIGMA	33209
Triethylammonium acetate	SIGMA	57619
Acetone	SIGMA	32201
Acetonitrile	SIGMA	RD-34967
Agarose Low EEO	FocusBio	FB-HA0604
Aminosilane	SIGMA	104884
Ammonium Chloride (NH ₄ Cl)	SIGMA	A9434
Ammonium Persulfate (APS)	Bio-Rad	161-0700
Biotin-PEG	Laysan Bio	Biotin-PEG-SVA-5000-100 mg

Boric acid	Cyrusbioscience	101-10043-35-3
Chloroform	SIGMA	C2432
3,4-Dihydroxybenzoic acid (PCA)	SIGMA	37580
DL-Dithiothreitol (DTT)	SIGMA	D9779
dNTP mixture	Genomics	GN-NTP-102
EDTA	ThermoFisher	AM9260G
Ethanol	SIGMA	32221
Gel Loading Dye, Purple (6X), no SDS	New England BioLabs	B7024S
HEPES	SIGMA	H3375
Hydroxylamine hydrochloride (NH ₂ OH-HCl)	J.T.Baker	5470-11-1
Imidazole	SIGMA	I5513
Methanol	J.T.Baker	9073-05
Neutravidin	ThermoFisher	31000
N,N,N',N' - Tetramethylethylenediamine	SIGMA	T9281
Novel Juice	GeneDireX	LD001-1000
One Mark 100	GeneDireX	DM101-0100
Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (125:24:1)	SIGMA	P1944-100 ml
Potassium Chloride (KCl)	SIGMA	P9541
Potassium hydroxide (KOH)	Honeywell	30603

RiboRuler Low Range RNA Ladder	ThermoFisher	SM1831
RNase-free spray	APEX	10-228
RNA Gel Loading Dye (2X)	ThermoFisher	R0641
RNA Loading Dye (2X)	New England BioLabs	N0362S
Sodium bicarbonate (NAHCO ₃)	SIGMA	S6014
Sucrose	J.T.Baker	4097-04
Sulfo-Cyanine3 NHS ester	Lumiprobe	41320
Sulfo-Cyanine5 NHS ester	Lumiprobe	43320
SYBR Green I	ThermoFisher	S33102
SYBR Green II	Bio-Rad	Mo-8882AP
Trolox	SIGMA	238813
Urea	SIGMA	U5378
液態氮	廣益	
氮氣	板橋氣體	

2.1.3 Constructs

Name	Sequence (5' to 3')	Source of the materials
CoV2 full RNA	GAGAGGAGGUAAUAUGUUU AAACGGGUUUGCGGUGUAAGU GCAGCCCGU*CUUACACCGUGC GGCACAGGCACUAGUACUGAU GUCGUAU*ACAGGGCUUUU	CoV2-UTR + CoV2u + CoV2d

U* : 5'Aminohexylacrylamino-uridine, 5-AHA-U



2.1.4 酶

物品	製造商	產品編號
Bacterial Protocatechuate 3,4-Dioxygenase (PCD)	OYC Americas	46852004
DNA polymerase I, Large (Klenow) Fragment	New England BioLabs	M0210S
DNase I, RNase-free	ThermoFisher	EN0521
Exonuclease Lambda	New England BioLabs	M0262S
Exonuclease V (RecBCD)	New England BioLabs	M0345S
phi29 DNA polymerase	New England BioLabs	M0269S
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	New England BioLabs	M0491S
SUPERase•In™ RNase Inhibitor	ThermoFisher	AM2696
T4 DNA Ligase	New England BioLabs	M0202S
T4 Polynucleotide Kinase (T4 PNK)	New England BioLabs	M0201S

2.1.5 Kits

物品	製造商	產品編號
HiScribe™ T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit	New England BioLabs	E2050S
In vitro transcription MegaClear MiniPlus	ThermoFisher	AM1908

Monarch® RNA Cleanup Kit (50µg)	New England BioLabs	T2040S
PCR advanced PCR Clean Up System	Viogene	PF2002
RNA Clean & Concentrator-5	ZYMO RESEARCH	R1015
ZR small-RNA PAGE Recovery Kit	ZYMO RESEARCH	R1070
Pierce™ RNA 3' End Biotinylation Kit	ThermoFisher	20160

2.1.6 序列

【RNA 序列】

Name	Sequence (5' to 3')	Source of the materials
CoV2-UTR	GAGAGGAGGUAAUAAUAUGUUUAAACG GGUUUGCGGUGUAAGUGCAGC	T7 in vitro transcription
CoV2d	AGUACUGAUGUCGUAAU*ACAGGGCUUU U	Dharmacon
CoV2u	CCGU*CUUACACCGUGCGGCACAGGCA CU	Dharmacon

U* : 5-Aminohexylacrylamino-uridine, 5-AHA-U

【DNA 序列】

Name	Sequence (5' to 3')	Source of the materials
5' CoV2-klenow-primer	CGGGAGATGTGCAAGACTGT	Genomics
5'P+primer+CoV2(F)	5'P-CGGGAGATGTGCAAGACT	Genomics

	GTTAAGAAGGAGGTATAATAT GTTTAAACGGG	
CoV-5'UTR (F)	GCTCTAATACGACTCACTATAG GGAGAGGAGGTATAATATGTT TAAACGGGTTTGCG	Genomics
CoV-5'UTR(R)	AGATGCCATGCCGACCCGCTG CACTTACACCGCAAACCCGTT TAAACA	Genomics
CoV2 amplify(F)	GCTCTAATACGACTCACTATAG GG	Genomics
CoV2-HDV amplify(R)	AAACGACGGCCAGTGCCAAG CTTCTCCCTTAGCCTACCGAA	Genomics
CoV2 full DNA 5'AGA (R)	AGAAGGAGGTATAATATGTTT AAACGGGTTTGCGGTGTAAGT GCAGCCCGTC	Genomics
CoV2 full length amplify(R)	AAAAGCCCTGTATACGACATC AG	Genomics
CoV2 full length DNA splint	AAAAGCCCTGTATACGACATC AGTACTAGTGCCTGTGCCGCA CGGTGTAAGACGGGCTGCACT TACACCGCAAACCC	Genomics
CoV2-HDV(F)	CAGCGGGTCGGCATGGCATCT CCACCTCCTCGCGGTCCGACC TGGGCTA	Genomics

CoV2-HDV(R)

CTTCTCCCTTAGCCTACCGAA
GTAGCCCAGGTCGGACCGCG
AGGA

Genomics



5'P : 5' phosphorylation DNA



2.2 方法

【RNA 製備】

1. 利用 Klenow 將 CoV2-5'UTR 及 CoV2-HDV DNA 延長

a. 黏合引子

	CoV2-5'UTR	CoV2-HDV DNA	Final Conc.
10 μM primer (F)	2.5 μ l	2.5 μ l	2.5 μ M
10 μM primer (R)	2.5 μ l	2.5 μ l	2.5 μ M
ddH₂O	4 μ l	4 μ l	
10 x T4 ligase buffer	1 μ l	1 μ l	1 x
total	10 μ l	10 μ l	

b. 先加熱至 80°C 維持 3 分鐘，並在 60 分鐘內 1 分鐘降 1°C 逐步降至 20°C

c. 以下列條件進行 Klenow 反應 (25°C, 15 分鐘)

	CoV2-5'UTR	CoV2-HDV DNA	Final Conc.
Pre-mix (anneal product)	10 μ l	10 μ l	
ddH₂O	34 μ l	34 μ l	
10 x T4 ligase buffer	4 μ l	4 μ l	1 x
10 mM dNTPs	1 μ l	1 μ l	0.2 mM
5U/μl Klenow	1 μ l	1 μ l	0.1U/ μ L
Total	50 μ l	50 μ l	

d. 使用 PCR Advanced PCR Clean Up System kit 進行純化

e. 測 OD260 並跑 2% 洋菜膠電泳

2. 透過 PCR 將 CoV2-UTR 全長 DNA 放大



a. 配置 PCR 反應溶液

	Vol.	Final Conc.
10 μM CoV2 amplify (F)	10 μl	0.5 μM
10 μM CoV2 amplify (R)	10 μl	0.5 μM
CoV2-5'UTR DNA	X μl	0.1-0.2 μg
CoV2-HDV DNA	X μl	0.1-0.2 μg
5x Q5 reaction buffer	40 μl	1 x
10 mM dNTPs	4 μl	0.2 mM each dNTP
2 U/μl Q5 DNA polymerase	2 μl	0.02 U/μl
ddH₂O	to 200 μl	

b. 以下列條件進行 PCR 反應

98°C	30 sec	} 20 cycle
98°C	10 sec	
53°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	2 min	

c. 使用 PCR Advanced PCR Clean Up System kit 進行純化

d. 測 OD260 並跑 2% 洋菜膠電泳

3. PK RNA 體外轉錄

a. 配置轉錄反應溶液

	Vol.	Final Conc.
CoV2-UTR full length	X μl	0.3-0.5 μg

DNA		
NTP buffer mix	10 μ l	10 mM each dNTP
T7 polymerase mix	2 μ l	
100 mM DTT	1 μ l	5 mM
ddH₂O	to 20 μ l	

b. 以下列條件進行轉錄反應 (37°C, 16 h)

提升自切反應：

70°C	10 sec	} 5 cycle
50°C	60 sec	
37°C	10 min	

c. 跑 Urea PAGE (7.6 M Urea, 1 x TBE, 10% gel) 100 V, 100 min

d. 使用 ZR small-RNA PAGE Recovery Kit 進行純化

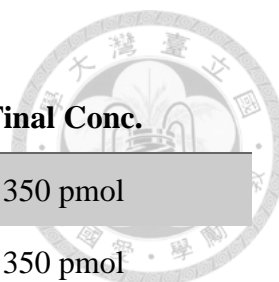
e. 測 OD260 並跑 2% 洋菜膠電泳

4. CoV2-UTR, CoV2u, CoV2d ligation

a. 將 PNK 反應溶液於 37°C 中反應 6 小時，將 CoV2u 及 CoV2d 5'端磷酸化並移除 RNA 的 3' 磷酸根，以便後續接合反應

	CoV2-UTR	CoV2u	CoV2d	Final Conc.
RNA	X μ l	X μ l	X μ l	~350 pmol
10 x T4 ligase	3 μ l	3 μ l	3 μ l	1 x
buffer				
10 U/μl PNK	2 μ l	2 μ l	2 μ l	0.66 U/ μ l
ddH₂O	to 30 μ l	to 30 μ l	to 30 μ l	

b. 配置以下溶液以黏合 DNA 模板及 RNA



	Vol.	Final Conc.
CoV2-UTR (PNK 產物)	30 μ l	350 pmol
CoV2u (PNK 產物)	30 μ l	350 pmol
CoV2d (PNK 產物)	30 μ l	350 pmol
10 x T4 ligase buffer	6 μ l	1 x
100 μM DNA splint	3 μ l	300 pmol
ddH₂O	to 150 μ l	

c. 先加熱至 80°C 反應 5 分鐘，並 1 分鐘降 1°C 降至 20°C

d. 配置以下溶液以接合 RNA 並反應於 25°C，18 小時

	Vol.	Final Conc.
黏合產物	150 μ l	
10 x T4 ligase buffer	1 μ l	1 x
400 U/μl DNA ligase	8 μ l	20 U/ μ l
20 U/μl SUPERase•In™ RNase Inhibitor	4 μ l	0.5 U/ μ l
Total	163 μ l	

e. 於產物中加入 6 μ l DNase I 並反應於 37°C，30 分鐘

f. 使用 Monarch® RNA Cleanup Kit 濃縮體積以便後續切膠純化

g. 跑 Urea PAGE (7.6 M Urea, 1 x TBE, 10% gel) 100 V, 100 min 並使用 ZR small-RNA PAGE Recovery Kit 進行純化

h. 測 OD 全波長並跑 2% 洋菜膠電泳

【RNA 3'biotinylation】

利用 Pierce™ RNA 3' End Biotinylation Kit (Thermo 20160) 將 RNA 3'端接上含



biotin 的 Cytidine :

1. 將 Kit 中除 30% PEG 外其餘項目於冰上退凍，30% PEG 則於 37°C 退凍 5-10 分鐘
2. 將 RNA 置於 85°C 3-5 分鐘並馬上插於冰上
3. RNA 3'biotinylation
 - a. 配置以下溶液

	Vol.	Final Conc.
10 x RNA Ligase Reaction Buffer	3 μ l	1 x
RNase Inhibitor	1 μ l	1.33 U/ μ L (40 U)
RNA	X μ l	Up to 50 pmol
Biotinylated Cytidine (Bis)phosphate	1 μ l	33.3 μ M (1 nmol)
T4 RNA Ligase	1 μ l	1.33 U/ μ L (40 U)
Nuclease-free Water	to 15 μ l	

- b. 配置好的溶液中加入 15 μ l 30% PEG，並用新的 tip pipetting 混合
 - c. 於 16°C 反應 18 小時
4. 跑 Urea PAGE 確認 biotinylation 效率

【ssDNA 製備】

製備單股 DNA 作為 handle 以供 RNA annealing

1. 利用 Klenow 將 CoV2 full length DNA splint 延長
 - a. 黏合引子

	Vol.	Final Conc.
10 μM CoV2 full length DNA splint	2.5 μ l	2.5 μ M
10 μM CoV2 full DNA 5'AGA (R)	2.5 μ l	2.5 μ M



ddH₂O	4 μ l	
10 x T4 ligase buffer	1 μ l	1 x
Total	10 μ l	

b. 先加熱至 80°C 維持 3 分鐘，並在 60 分鐘內 1 分鐘降 1°C 逐步降至 20°C

c. 以下列條件進行 Klenow 反應 (25°C, 15 分鐘)

	Vol.	Final Conc.
Pre-mix (anneal product)	10 μ l	
ddH₂O	34 μ l	
10 x T4 ligase buffer	4 μ l	1 x
10 mM dNTPs	1 μ l	0.2 mM each dNTP
5U/μl Klenow Fragment	1 μ l	0.1 U/ μ L
Total	50 μ l	

d. 使用 PCR Advanced PCR Clean Up System kit 進行純化

e. 測 OD₂₆₀ 並跑 2% 洋菜膠電泳

2. 透過 DNA 放大合成一股 5' 端帶有磷酸的雙股 DNA

a. 配置 PCR 反應溶液

	Vol.	Final Conc.
10 μM 5'P+primer+CoV2 (F)	10 μ l	0.5 μ M
10 μM CoV2 full length amplify(R)	10 μ l	0.5 μ M
CoV2 5'AGA DNA	X μ l	0.2-0.4 μ g
5x Q5 reaction buffer	40 μ l	1 x
10 mM dNTPs	4 μ l	0.2 mM each dNTP
2 U/μl Q5 DNA polymerase	2 μ l	0.02 U/ μ l



ddH₂O to 200 μ l

b. 以下列條件進行 PCR 反應

98°C	30 sec	} 20 cycle
98°C	10 sec	
53°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	2 min	

c. 使用 PCR Advanced PCR Clean Up System kit 進行純化

d. 測 OD260 並跑 2% 洋菜膠電泳

3. 利用 Exonuclease Lambda 將 5'P CoV2 DNA 切成 ssDNA

a. 使用以下的溶液配置進行外切酶反應 (37°C, 30 分鐘)

	Vol.	Final Conc.
5'P CoV2 DNA	X μ l	up to 5 μ g
ddH ₂ O	12 μ l	
Lambda reaction buffer (10x)	2 μ l	1 x
Exonuclease Lambda	1 μ l	5 unit/reaction
Total	20 μ l	

b. 加入 4 μ L ddH₂O 及 1 μ L 0.25 M EDTA (Final Conc. = 10 mM) 並於 75°C, 10 分鐘終止外切酶反應

c. 跑 10% native PAGE 確認 ssDNA 狀況



【RNA handle annealing】

透過將 RNA 與單股 DNA anneal 使 RNA 建構出線性 RNA

1. 配置以下 DNA 及 RNA 的混合溶液以備接下來的黏合反應

	Final Conc.
CoV2 full RNA	~0.1 μ M
5' CoV2-klenow primer	5 μ M
CoV2 dsDNA	~1 μ M

2. 透過 Annealing buffer 將 DNA, RNA 及 primer 進行黏合

	Vol.	Final Conc.
Annealing buffer	16	80% of total volume (Formamide ~ 70%)
DNA/RNA mixture	4	
	20	

a. 以下列條件進行 RNA 與 DNA 的黏合

85°C 10 min

62°C 90 min

52°C 90 min

10 min 降至 10°C

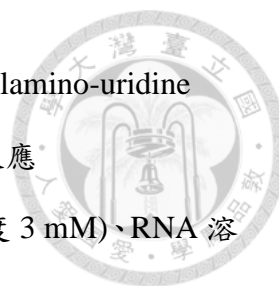
b. 以 KLB 或 phi29 buffer (smFRET 實驗需求) 7 倍稀釋 annealing mixture 並

以以下條件加強 primer 黏合

50°C 5 min

1 min 降 1°C 至 20°C

【RNA dye labeling】



CoV2u 及 CoV2d 在特定位置上具有經修飾的 5' aminohexylacrylamino-uridine (5-AHA-U)，其上具胺基可以與 Sulfo- Cyanine NHS ester dye 反應

1. 將 Sulfo- Cyanine NHS ester dye 溶於 DMSO 中(dye 最終濃度 3 mM)、RNA 溶於 0.1 M NaHCO₃, pH = 8.5 中(RNA 最終濃度 1 mM)
2. 將同體積的 RNA 及 dye 混合並輕晃於 25°C 過夜 (避光),再置於 37°C 中,60 min (避光)
3. 於混合物中加入 30 µl NH₂OH-HCl 並輕晃於 25°C, 15 min 以終止反應
4. 於以上溶液中加入 1 ml Buffer A 以增加反應體積
5. 以 FPLC 在以下條件純化 RNA-dye

Buffer A : 0.1 M Triethylammonium acetate

Buffer B : 100% acetonitrile

兩種 buffers 皆須脫氣 20 分鐘

Column : Symmetry C8 Column, 100Å, 5 µm, 4.6 mm X 250 mm, 1/pk

Detection : 254 nm

Flow rate : 0.5 mL/min

Gradient : 0% Buffer B-100% Buffer B in 5 column volume

Fraction size : 0.5 mL

- A. 使用 Labconco FreeZone 2.5 Plus Benchtop Freeze Dry System (10 樓共儀室)將樣品除液
 - a. 每一管需於管口封鋁箔紙並用針扎 20-30 個小洞
 - b. 用液態氮將樣品冷凍並利用冷凍抽氣去除液體
- B. 將 RNA-dye 回溶於 ddH₂O
- C. 用 3K Cetricon 完整去除 free-dye
 - a. 將 RNA-dye 加入 3K Cetricon 並補 ddH₂O 至 500 µL
 - b. 10,000g 離心 10 分鐘



c. 重複 a、b 步驟 3 次

D. 測 A260 及 A548(Cy3)或 A648(Cy5)的 OD 以計算濃度

【smFRET】

1. 配置 1x FRET buffer，並預熱蓋玻片與載玻片
2. 配置 Neutravidin 溶液、image buffer、使用雙面膠將蓋玻片與載波片黏合，並使用 1x FRET buffer 清洗每個 chamber 兩次
3. 依比例稀釋樣品以符合實驗濃度
4. 測試玻片品質：於一 chamber 內沖入 60 μ l 的樣本，並使用 1x FRET buffer 清洗兩次。拍攝 chamber 以確定是否有過多雜點出現
5. 於各個 chamber 沖入 60 μ l NeutrAvidin mixture 以和玻片上的 biotin-PEG 反應，等待 20 分鐘後，再用 1x FRET buffer 清洗兩次以清除多餘的 NeutrAvidin mixture
6. 沖入 60 μ l 的樣本並等待 10 分鐘待 RNA-biotin 與 NeutrAvidin 反應，再用 1x FRET buffer 清洗一次以去除多餘樣本
7. 沖入 60 μ L Image buffer 並確認 RNA 狀況
8. 依實驗需求配置不同 enzyme-imaging buffer mixture
 - a. Klenow Fragment

	Final Conc.
Trolox solution (KLB)	to 60 μ L
PCA	2.5 mM
PCD	0.21 U/mL
dNTPs	依實驗需求
Klenow	0.1 U/ μ L

b. Exonuclease V (RecBCD)

	Final Conc.
Trolox solution (KLB)	to 60 μ L
PCA	2.5 mM

PCD	0.21 U/mL
ATP	依實驗需求
Exonuclease V	0.2 U/ μ L



c. phi29 polymerase

	Final Conc.
Trolox solution (phi29 buffer)	to 60 μ L
PCA	2.5 mM
PCD	0.21 U/mL
dNTPs	依實驗需求
Recombinant Albumin	0.1 mg/ml
DTT	4 mM
phi 29 polymerase	0.16 U/ μ L

三、結果



3.1 SARS-CoV-2 偽結 RNA 製備

為了模擬 RNA 在框架位移發生時的再摺疊過程，需要製備出已知具有框架位移能力的 RNA，並透過 Cy3、Cy5 間 FRET 的變化探討 RNA 構型的改變。本實驗我們以 SARS-CoV-2 偽結作為樣本。

為了要製備出 SARS-CoV-2 偽結全長 RNA，我們將 RNA 分為三段製備：CoV2-UTR、CoV2u-Cy3、CoV2d-Cy5，後兩段 RNA 分別在 SARS-CoV-2 偽結中的 U19 及 U58 使用 aminohexylacrylamino 修飾，以便後續染劑的標定；而 CoV2-UTR 包含 SD 序列、起始密碼子以及 SARS-CoV-2 偽結 5'端延伸的滑動序列 UUUAAAC (圖 2)。

3.1.1 CoV2-UTR

由於後續實驗需利用 DNA ligase 將三條 RNA 進行 ligation，CoV2-UTR 3'端需剛好接合 CoV2u 的 5'端，然而在一般細胞外轉錄時因 RNA 聚合酶終止位置的差異，會形成 3'端長短不一的 RNA。為了後續 ligation 的進行，我們參考 Schürer, H et al.2002 的方法，藉由 HDV ribozyme 自切的能力，轉錄出等長 3'端的 RNA (圖 3)。為求 HDV ribozyme 自切效率的最佳化這裡比較了在不同 Mg^{2+} 濃度及 HDV ribozyme 摺疊溫度下自切的效率，發現了無論增加 Mg^{2+} 濃度或是調整自切反應 HDV ribozyme 摺疊時的溫度都不會嚴重影響 HDV ribozyme 的自切效率 (圖 4)；此外，我們發現了 HDV ribozyme 在我們設定的這些條件下自切效率始終不盡理想，多數 RNA 仍維持在完整的 CoV2-UTR-HDV 狀態 (圖 4a 紅框處)，進而導致最終 CoV2-UTR 的產量較低，依 Schürer, H et al 的方式額外延長 HDV 3'端 20 個鹼基的長度，結果顯示在序列不影響 HDV ribozyme 摺疊構型的情況下延長 HDV 3'端能有效提升 HDV ribozyme 的自切效率 (圖 4b)，並進一步提高 CoV2-UTR 的




產量。

3.1.2 Dye labeling

為了能在 FRET 實驗中探討 RNA 構型的變化，我們分別使用 Sulfo-Cy3 NHS ester 與 Sulfo-Cy5 NHS ester 透過經修飾的 5' aminohexylacrylamino-uridine label 在 CoV2u 的 U19 及 CoV2d 的 U58 上。經過在 0.1 M NaHCO₃ 反應 O/N 並使用 FPLC (使用 C8 column) 進行純化，CoV2u-Cy3、CoV2d-Cy5 分別在 acetonitrile 82% 及 59.9% 時被 elute 出來 (圖 5)，這裡由於 C8 column 是利用混合物中各成份的極性的不同以分離物質，而可能因為 CoV2u-Cy3 與 CoV2d-Cy5 的極性相差較大，導致兩 RNA-dye 所 elute 出的位置相距很遠。在 FPLC 過程中我們發現 RNA-dye、free dye 可能因為極性相差不大導致二者無法被有效分離，這裡若 RNA-dye 與 free dye 能在 FPLC 階段被分離則可直接利用冷凍乾燥機將 acetonitrile 去除，並再以 ddH₂O 回溶 RNA 以供使用，然而本次實驗中 RNA-dye 與 free dye 未被分離，因此使用 3K centricon 置換 buffer 並離心 3 次以去除殘留的 free dye，後經比較 RNA 與 dye 之 extinction coefficient 及 OD₂₆₀、550、646 後得 CoV2u-Cy3 label 效率為 121% 而 CoV2d-Cy5 為 142% (表 1)。依 label 效率分析 CoV2u-Cy3 與 CoV2d-Cy5 溶液內皆有殘存的 free dye，不過由於後續 construct 製備會經過 PAGE 切膠純化便能有效去除 free dye，故我們以 OD₂₆₀ 計算 RNA 濃度，得 CoV2u-Cy3 140.7 μM 及 CoV2d-Cy5 192.6 μM。

3.1.3 SARS-CoV-2 full RNA

製備 SARS-CoV-2 偽結全長 RNA 要把 3 段 RNA：CoV2-UTR (47 nt)、CoV2u-Cy3 (28 nt)、CoV2d-Cy5 (27 nt) 進行接合，我們將 3 段 RNA 與 SARS-CoV-2 full length DNA splint 進行黏合以確保 3 段 RNA 依正確順序排列，即 CoV2-UTR_CoV2u-Cy3_CoV2d-Cy5，並使用 T4 DNA ligase 做接合反應。由於



RNA 與 DNA 的黏合不一，接合產物無可避免的會出現 CoV2-UTR_CoV2u-Cy3 (75 nt)、CoV2u-Cy3_CoV2d-Cy5 (55 nt)或單獨的小片段 RNA 等情況 (圖 6)，因此我們還需跑 denature urea PAGE 將各片段分離並切膠以純化出 SARS-CoV-2 偽結全長 RNA。

3.1.4 互補 ssDNA 製備

要研究 SARS-CoV-2 偽結的再摺疊過程，需要先將 SARS-CoV-2 偽結展開形成線性 RNA，並且有方向性的從 RNA 5'端模擬偽結的重新摺疊，SARS-CoV-2 RNA 與其互補股的黏合是一種有效的方式。本實驗透過將一股 5'端帶有磷酸根的 primer (5'P+klenow+CoV2(F))進行 PCR，一方面製備出一股帶有 5'磷酸根的 DNA，另一方面延長 RNA 互補 DNA 以提供 klenow primer 的黏合位；雖 exonuclease lambda 為 5' to 3' exonuclease，然而其會辨認 5'磷酸根並更傾向消化該股，藉由此特性，我們可以製備出 SARS-CoV-2 偽結 RNA 的互補 ssDNA (圖 7)，以便後續 RNA/DNA 的黏合。我們測試了 exonuclease lambda 分別在 30 分鐘、1 小時、2 小時作用下 ssDNA 製備的效率，發現了 exonuclease lambda 在這三個時間段皆有效的製備出所需的 ssDNA (圖 7b)，然而在 30 分鐘下仍然有少部分的 dsDNA，而 2 小時作用下的 ssDNA 又相對 1 小時的低，因此在 ssDNA 的製備，選用了 1 小時的反應時間。

3.2 SARS-CoV-2 偽結的再摺疊

為了模擬出核糖體經過 SARS-CoV-2 偽結解開結構且在後續實驗中需要方向性的從 5'端開始釋放 RNA 以模擬 RNA 的再摺疊過程，我們參考了 Arslan, S et al. 2015 的針對解開 dsDNA 並使 ssDNA 摺疊的方法並改以 SARS-CoV-2 pseudoknot – DNA hybrid 進行實驗，我們首先會將 SARS-CoV-2 偽結 RNA 與互補 DNA 黏合使 RNA 回到線性結構(如 3.1 所述)，再利用不同 enzyme 作用將兩

者從 RNA 5'端開始分離，使 RNA 重新摺疊並觀察摺疊過程中中間態的形成與否。




3.2.1 SARS-CoV-2 偽結 RNA

SARS-CoV-2 偽結 RNA 最穩定的構型為偽結，利用這個特性，我們在 SARS-CoV-2 RNA stem 2 上的 U19 與 loop 3 上的 U58 分別標記了 Cy3 及 Cy5 (兩鹼基依 Protein Data bank 結構[PDB ID: 7O7Y]預測在偽結形成時兩鹼基相距約為 2.1 nm)，並在 3'端接合了 Cytidine-biotin 以供 RNA 固定於 slide 上 (圖 8)，其中圖 8a 呈現的是 SARS-CoV-2 偽結 RNA 的二級結構預測圖；而圖 8b 是 SARS-CoV-2 偽結 RNA 的晶體結構。於單分子層面上觀察發現大部分分子顯現出 0.96 的穩定高 FRET 值 (圖 8c、8d)，代表 SARS-CoV-2 RNA 如預期的呈現偽結結構。為了模擬核糖體通過 RNA 時 RNA 結構被解開又重新摺疊的過程，我們將 SARS-CoV-2 RNA 與其互補 DNA 及 primer 進行黏合 (圖 9a)，一方面模擬 RNA 結構被打開的當下，另一方面準備 primer 以供後續再摺疊的條件。值得注意的是為求 DNA 聚合酶的順利 binding，SARS-CoV-2 RNA 5'端有 3 個鹼基不與互補 DNA 配對形成一個 gap。由於黏合後的 SARS-CoV-2 RNA 形成線性，Cy3 與 Cy5 距離被拉開至 39 個鹼基對，使得 FRET 值呈現穩定的 low FRET, 0.15 (圖 9b、9c)。為了模擬 RNA 由 5' -> 3'再摺疊的過程，有兩個可用的方案：1. 藉 DNA 聚合酶沿 primer 3'端聚合並取代 RNA 股使 RNA 與 DNA 由 5' -> 3'分離 (圖 10)；2. 使用 DNA 外切酶將互補 DNA 由 5'端逐步去除使 RNA 自 5' -> 3'重新摺疊 (圖 11)。

3.2.2 DNA polymerase I, Klenow Fragment

DNA polymerase I, Klenow Fragment 作為分生實驗中主要用於填補 DNA overhang 的 enzyme，具有部分的 strand displacement activity。在 RNA 狀況確認後，0.1 U/ μ L Klenow Fragment 及 0.2 mM dNTPs 被加入並觀察兩分鐘內 FRET 隨



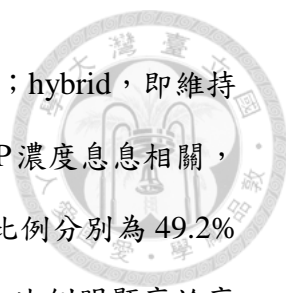
時間的變化(圖 12)，我們發現絕大多數的分子都維持穩定的 low FRET，並沒有如預期般有 RNA 結構上面的變化，而待整個 Klenow Fragment 完全反應後 (15 分鐘)，分子主要的族群分布集中在 0.14，與 RNA/DNA hybrid 的 FRET 值, 0.15 並無差距，顯示了在本實驗上 Klenow Fragment 不具備足夠 strand displacement activity 能有效的將 SARS-CoV-2 RNA 與其互補股分離。

3.2.3 Exonuclease V (RecBCD)

我們同樣使用圖 8a 所製備的 RNA/DNA hybrid 進行 Exonuclease V 的實驗，實驗中的 Exonuclease V 濃度皆為 0.2 U/ μ L。首先，在只有 Exonuclease V (無 ATP) 作用下 FRET 隨時間並沒有什麼變化，多數分子維持在 low FRET 狀態 (圖 13)，而待 Exonuclease V 反應 15 分鐘後去除 enzyme 並於 42 °C 加熱 5 分鐘以穩定 RNA 後，分子主要分布在 0.17，代表 SARS-CoV-2 RNA 仍與互補 DNA 黏合，呈 hybrid 態，以此證實了 Exonuclease V 在無 ATP 參與的情況下無法正常作用。

當與 1 mM ATP 共同作用下，FRET 隨時間具有主要 4 種 trace，第一是自始而終皆維持在 RNA/DNA hybrid 態而 FRET 保持在 < 0.2 (圖 14a)，約有 49%；二是當加入 Exonuclease V 及 ATP 當下便完全反應 SARS-CoV-2 RNA 形成 FRET > 0.8 的偽結結構 (圖 14b)，約有 23%；三是維持在 0.2 到 0.8 間且 FRET 值無明顯變化的 intermediate (圖 14c)，約有 8%；最後是在 Exonuclease V 反應過程中有著大幅度動態變化的 dynamic (圖 14d)，約有 19%，其中 SARS-CoV-2 RNA 可能會在 low FRET、intermediate、high FRET 間切換，並無固定規律。

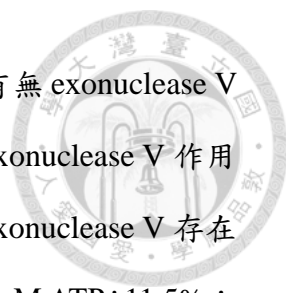
當進行 SARS-CoV-2 RNA-DNA hybrid 於 Exonuclease V 與分別在 1 mM、0.1 mM、10 μ M ATP 作用下各種 trace 的比較(圖 15, 表 2)，發現了具動態變化的 trace 無論 ATP 濃度高低比例上皆無太大變化，分別為 19.4%、18.9%、17.7%；維持在 intermediate 的 trace 就如同預測的，由於其結構上的不穩定，在 3 種 ATP 濃



度下，比例均為 4 種 trace 中最低，分別為 8.3%、14.0%、7.7%；hybrid，即維持在 low FRET 與快速回到偽結，即穩定 high FRET 的比例便與 ATP 濃度息息相關，在 1 mM 和 0.1 mM ATP 下維持在 hybrid 的 SARS-CoV-2 RNA 比例分別為 49.2% 及 44.4%，然而，在 10 μ M ATP 下 hybrid 的 RNA 則為 61.2%，比例明顯高於高 ATP 濃度的組別；反之，在 1 mM 和 0.1 mM ATP 作用下，RNA 回到偽結的比例分別為 23.1% 與 22.7%，10 μ M ATP 則為 13.5%。此結果表示了 Exonuclease V 雖然需要 ATP 啟動其反應機制，然而，ATP 濃度僅在小於 0.1 mM 情況下與 Exonuclease V 呈正相關，在大於 0.1 mM 後作用效率幾乎沒有變化。

我們繼續對於 SARS-CoV-2 RNA-DNA hybrid 在 Exonuclease V 與不同 ATP 濃度作用下的動態變化進行速率分析探討 RNA 在各個構型間的變化速度與其 FRET 分布 (圖 16, 表 3)，這裡將 RNA 分為 3 個 state：State 1 代表 SARS-CoV-2 RNA/DNA hybrid (low FRET)、State 2 代表 intermediate (middle FRET)、State 3 代表偽結 (high FRET)，我們發現無論 ATP 的濃度高低，RNA 均會傾向由 State 1 往 State 2 進行；而 State 2 與 State 3 之間除了更傾向由 State 3 往 State 2 進行外，我們還發現兩者間的速率變化皆相較於其他 state 間有著明顯的提升，這可能是 State 2 與 State 3 兩狀態間的不穩定所致，也進一步證實了 intermediate 的不穩定且更傾向轉換為穩定的偽結而非不穩定的線性 RNA；最後則是 State 1 及 State 3 無論 ATP 濃度在 Exonuclease V 仍然存在下，我們並沒有發現兩 state 之間的轉換速率有明顯的規律。

為了免除可能的因 Exonuclease V 與 ATP 存在於環境中進而影響 SARS-CoV-2 RNA 的構型變化，在反應了 15 分鐘後，我們將 Exonuclease V 與 ATP 去除(圖 17, 表 4)，發現了 10 μ M ATP 組的 RNA 具動態變化的 trace 有著較顯著的下降，約 11.5%，而 1 mM 與 0.1 mM 組分別為 16.9% 及 19.1%，與 Exonuclease V 存在的情況差異相對較低，而若將 intermediate 及 dynamic 這兩組



較不穩定的 RNA 相加比較可以發現在 10 μ M ATP 下無論是在有無 exonuclease V 這個比例都是最低的，這可能說明了由於低 ATP 濃度造成的 Exonuclease V 作用效率低，導致開始反應的分子數也低；intermediate 的比例與 Exonuclease V 存在時相差不大，分別佔 1 mM ATP: 10.3%、0.1 mM ATP: 15.3%、10 μ M ATP: 11.5%；而 hybrid 及偽結也因為 Exonuclease V 反應完全，在各個 ATP 濃度下比例分別下降與上升(hybrid: 1 mM, 41.6%、0.1 mM ATP, 34.7%、10 μ M, 58.5%；pseudoknot: 1 mM, 31.2%、0.1 mM ATP, 30.9%、10 μ M, 18.9%)。值得注意的是 0.1 mM ATP 組的 intermediate 及 dynamic 這些不穩定結構的 RNA 相對於 1 mM ATP 組高了 7.2%，這可能也說明了雖然 ATP 於 0.1 mM 以上皆能將一定比例的 SARS-CoV-2 RNA-DNA hybrid 作用回偽結，然而也更容易形成一些作用到一半的不穩定結構。我們進一步分析此情況下具動態變化之 RNA 構型變化的速率(圖 18, 表 5)，發現 RNA 依然傾向由 State 1 到 State 2、State 3 到 State 2，且後者兩 state 間的轉變速率仍較高，屬於較不穩定的族群；然而，State 1 與 State 3 間不像 Exonuclease V 存在時的沒有規律，RNA 傾向由 State 1 到 State 3，這也與我們預測的相同，SARS-CoV-2 RNA/DNA hybrid 在 Exonuclease V 作用下會更傾向於由 hybrid 變成 intermediate 再變回偽結或部分是由 hybrid 快速變回偽結。值得探討的是偽結變到 intermediate 的比例很高，目前仍無法確認實際原因。

最後比較 SARS-CoV-2 RNA 在 Exonuclease V 完全反應並於 42 °C 加熱 5 分鐘穩定 RNA 後整體分子的 FRET 分布 (圖 19)，得出 Exonuclease V 在 1 mM ATP 作用下有 57% 的分子維持在 hybrid 狀態 (FRET = 0.178)，而有 43% 會回到偽結結構 (FRET = 0.939)；在 0.1 mM ATP 作用下有 61% 的分子維持在 hybrid 狀態 (FRET = 0.178)，而有 39% 會回到偽結結構 (FRET = 0.923)，前面兩者相異不大；而在 10 μ M ATP 下大多數的分子 (82%) 會維持在 hybrid 狀態 (FRET = 0.186)，而僅僅只有 18% 會回到偽結結構 (FRET = 0.927)，這邊也與上述的速率變化結果

相吻合。



3.2.4 phi29 DNA polymerase

針對先前 DNA polymerase I, Klenow Fragment 無法作用於 SARS-CoV-2 RNA-DNA hybrid 取代互補 DNA 形成 dsDNA 與 ssRNA, 於是我們使用擁有更強的 strand displacement 效率的 phi29 DNA polymerase 去進行此實驗, 實驗中 phi29 DNA polymerase 的濃度皆為 0.16 U/ μ L。首先, 在 phi29 DNA polymerase (無 dNTPs) 作用下, 我們可以由 FRET 隨時間變化圖及高斯分布(圖 20)發現在 phi29 DNA polymerase 無法在沒有 dNTPs 下去改變 SARS-CoV-2 RNA-DNA hybrid 的構型, FRET 主要分布在 0.14, 以此作為 negative control。

在加入 0.2 mM dNTPs 後, phi29 DNA polymerase 會開始作用並使 SARS-CoV-2 RNA-DNA hybrid 發生構型上的改變 (圖 21, 圖 22, 表 6)。當 phi29 DNA polymerase 開始滑動於 RNA-DNA hybrid 上時, 第一時間它會先靠近 CoV2u-Cy3 並造成 PIFE (protein induced fluorescence enhancement), 之後有些分子會如圖 21b 快速地重新摺疊回偽結, 而有部份分子會如圖 21a 形成短時間存在的 intermediate 再重新摺疊回偽結, 這類分子[dynamic (polymerization), 表 6]共佔約 2.8%, 而其餘具動態變化的分子[dynamic (unstable)]則沒有明顯規律, 會在不同構型間轉換 (圖 21d), 佔 8.1%, 值得注意的是有些分子會因 phi29 DNA polymerase 靠近 CoV2u-Cy3 位置導致 PIFE (圖 21c)。剩下的分子皆會維持穩定: FRET 穩定在 0.8 以上 (圖 21f), 即 RNA 會穩定在偽結的比例佔 10.0%, 而仍有 77.6% 沒有受到 phi29 DNA polymerase 的催化, 會停留在 low FRET (圖 21e)。以此, 我們與較高濃度的 0.5 mM dNTPs 比較各個 trace 的比例, 發現隨 dNTPs 濃度提高 SARS-CoV-2 RNA-DNA hybrid 的比例有所下降, 然而這些分子並沒有摺疊回偽結, 反而是會維持在 intermediate; 至於動態變化的分子比例就 dNTPs 濃



度高低則沒有明顯差異。

我們接著將 phi29 DNA polymerase 與 dNTPs 在作用 15 分鐘後從環境中去除以防止它們影響 RNA 的結構摺疊 (圖 23, 表 7), 經去除前後比較發現在 0.5 mM dNTPs 組所增加的 intermediate 及具動態變化等較不穩定的 RNA 比例會明顯下降, 並且摺疊回偽結的 RNA 比例大大的上升, 這邊可能代表 phi29 DNA polymerase 會一定程度上影響 RNA 的摺疊, 使 RNA 無法維持穩定。


最後, 我們比較在 40 μ M、0.2 mM、0.5 mM 三種不同 dNTPs 濃度下 phi29 DNA polymerase 作用 15 分鐘後並去除 enzyme 及 dNTPs 並於 42°C 加熱 5 分鐘穩定 RNA 後整體分子的分布 (圖 24)。與預期的相符 dNTPs 的濃度越高, 偽結的比例也就越高, 在低濃度 40 μ M dNTPs 中僅有 5% 的 SARS-CoV-2 RNA-DNA hybrid 會被完全轉換並重新摺疊回偽結 (FRET = 0.927), 其餘 95% 則維持在 RNA-DNA hybrid 狀態 (FRET = 0.164); 將 dNTPs 濃度提升 5 倍至 0.2 mM, 摺疊回偽結 (FRET = 0.924) 的比例也提升約 5 倍至 28%, 而剩下的 72% 會保持在 RNA-DNA hybrid 狀態 (FRET = 0.158); 當 dNTPs 再提高 2.5 倍至 0.5 mM 後, 會有更多的偽結比例 (FRET = 0.934, 37%), 63% 的 RNA-DNA hybrid (FRET = 0.152) 則不會有構型上的改變, 顯然 dNTPs 在 0.5 mM 以下, phi29 DNA polymerase 作用效率與 dNTPs 濃度成正相關。

四、討論



根據我們目前的結果顯示，對 SARS-CoV-2 RNA-DNA hybrid 而言 Klenow Fragment 不如預期的將 RNA strand 取代，反而多數分子維持在 RNA-DNA hybrid 狀態，對於此結果有幾種可能性，一是 Klenow Fragment 的 strand replacement 能力雖能 unwind DNA-DNA duplex 卻不足以將 RNA-DNA hybrid 分離，由此我們選用在分生實驗上常用於做 strand replacement 應用的 phi29 DNA polymerase 進行確認；二是 Klenow Fragment 成功作用後由於其同時具有 reverse transcriptase 的能力 (Ricchetti, M & Buc, H. 1993)，雖然沒有相應的 DNA primer，但不確定 Klenow Fragment 是否會 bind 在 RNA 上使 RNA 無法成功摺疊回偽結結構導致仍呈現 low FRET 狀態，這點可能還需要更進一步的實驗去驗證。

Exonuclease V 在去除互補 DNA 方面就顯得很有效率，在有 ATP 參與無論濃度高低，SARS-CoV-2 RNA 皆有一定比例會發生構型上的變化，產生 intermediate 或是發生動態變化。值得探討的是在動態變化過程中，理論上在互補 DNA 被 digest 後 SARS-CoV-2 RNA 構型會轉變成偽結並維持穩定 high FRET，而不會再次變回 intermediate (middle FRET) 狀態，然而，在實驗上我們看到的是 SARS-CoV-2 RNA 無論在有無 enzyme 下除了部份分子有機會回到 low FRET 外不少分子會在 high FRET (State 3) 與 middle FRET (State 2) 之間快速改變，且 RNA 甚至還更傾向於 State 2 的結構。我們推測有以下幾個可能：由於 Exonuclease V 不只是 3'→5' 同時也是 5'→3' 外切酶，在酵素作用不完全的情況下 SARS-CoV-2 RNA 可能同時具有 3'、5' overhang (圖 25a)，此時 RNA 不但無法重新摺疊回偽結外，連 RNA-DNA hybrid 狀態也不夠穩定，進而導致 RNA 在兩狀態間迅速的切換；第二，Exonuclease V 作用時會先利用其 RecB 的 3'-5' 及 RecD 5'-3' helicase 功能 unwind DNA 再進行 DNA 的 digestion，然而由於 RecB 具較 RecD 慢的 helicase 速率 (Taylor, A & Smith, G. R. 2003)，3' 端 DNA 會堆積並形成 loop-tail

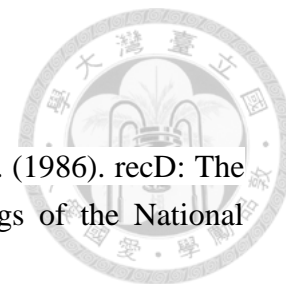


結構 (Taylor, A & Smith, G. R. 1980)，而在 unwind 的效率上受阻於 RNA-DNA hybrid 較 DNA-DNA duplex 穩定 (Casey, J & Davidson, N. 1977)，這些力的累積可能導致 Exonuclease V 難以完全 unwind 整個結構，使得 hybrid 會維持在不穩定的結構 (圖 25b)；第三，Exonuclease V 的外切酶作用是 endonucleolytic 的，digestion 的過程中會形成多個小 oligo，可能會導致這些互補的小 DNA oligo 仍與 SARS-CoV-2 RNA 黏合，形成圖 25c 的結果進而導致 RNA 結構的不穩定。後續實驗可以參考 Rosamond, J et al. 1979 所提到，調整反應中 Ca^{2+} 與 Mg^{2+} 濃度濃度比例可以在抑制 Exonuclease V 的外切酶能力下維持其 helicase 機能，由此探討前面所述的 RNA-DNA unstable hybrid 存在與否。另外，要使 Exonuclease V 僅由單一 3'-5' 進行反應也是下一步需要解決的課題，首先可以考慮改變互補 DNA 5' 端的 DNA 骨架，如 peptide nucleic acid (PNA) 或 locked nucleic acid (LNA) 皆能有效阻隔外切酶的活性 (Gupta, A et al. 2017., Frieden, M et al. 2003)；再者，由於 Exonuclease V 為 DNA helicase，在互補 SARS-CoV-2 RNA 3' 端接合一段 dsRNA 或許有機會能阻隔或減緩 Exonuclease V 從該端開始作用；最後，雖然單獨的 biotin 修飾無法阻止 Exonuclease V 作用，但當 DNA -5'biotin 與 slide 上的 Neutravidin 反應，能否有效阻隔 Exonuclease V 作用也值得我們後續進行嘗試。

使用 phi29 DNA polymerase 我們可以明顯發現 FRET 如我們所預期的讓 SARS-CoV-2 RNA 進行再摺疊並在其間可能會觀測到 intermediate 的短暫形成，不過這種 trace 的比例過低，僅有整體的 2% 左右，難以去比較 intermediate 產生的比例或是條件，而其實就算是在 0.5 mM dNTPs 下仍僅有 37% 會被 phi29 DNA polymerase 作用並重新摺疊回偽結，因此觀察到 phi29 DNA polymerase 作用中的比例低也是合理。由於 phi29 DNA polymerase 同時具備 3'-5'-exonuclease 的能力，會和 DNA polymerase 的功能互相拮抗，進而降低 polymerization 的效率，若能透過 site-mutation 降低 exonuclease 的功能或許是一件可以嘗試的方法。另外，DNA

polymerase 無論是 initiation 或是 elongation 皆受 2 價陽離子濃度所調控 (Dah, J. M. et al. 2016)，因此，調整 buffer 內的離子濃度也是下一步我們必須嘗試的項目。而在摺疊過程中所產生的 intermediate 對於-1 框架位移的效率影響可能還需要製備其他具有不同-1 框架位移效率的 RNA construct 以找尋其規律性。

參考資料



Amundsen, S. K., Taylor, A. F., Chaudhury, A. M., & Smith, G. R. (1986). recD: The gene for an essential third subunit of exonuclease V. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83, 5558-5562

Arai, Y., & Nagai, T. (2013). Extensive use of FRET in biological imaging. *Microscopy*, 62(4), 419–428. doi:10.1093/jmicro/dft037

Arslan, S., Khafizov, R., Thomas, C. D., Chemla, Y. R., & Ha, T. (2015). Engineering of a superhelicase through conformational control. *Science*, 348(6232), 344–347. doi:10.1126/science.aaa0445

Atkins, J. F., Loughran, G., Bhatt, P. R., Firth, A. E., & Baranov, P. V. (2016). Ribosomal frameshifting and transcriptional slippage: From genetic steganography and cryptography to adventitious use. *Nucleic acids research*, 44(15), 7007–7078. Doi:10.1093/nar/gkw530

Bajar, B., Wang, E., Zhang, S., Lin, M., & Chu, J. (2016). A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors*, 16(9), 1488. doi:10.3390/s16091488

Bernad, A., Blanco, L., & Salas, M. (1990). Site-directed mutagenesis of the YCDTDS amino acid motif of the Φ 29 DNA polymerase. *Gene*, 94(1), 45–51. doi:10.1016/0378-1119(90)90466-5

Bernad, A., Lazaro, J. M., Salas, M., & Blanco, L. (1990). The highly conserved amino acid sequence motif Tyr-Gly-Asp-Thr-Asp-Ser in alpha-like DNA polymerases is required by phage phi 29 DNA polymerase for protein-primed initiation and polymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4610–4614. doi:10.1073/pnas.87.12.4610

Bhatt, P. R., Scaiola, A., Loughran, G., Leibundgut, M., Kratzel, A., Meurs, R., ... Ban, N. (2021). Structural basis of ribosomal frameshifting during translation of the SARS-CoV-2 RNA genome. *Science*, 372(6548), 1306–1313. doi:10.1126/science.abf3546

Blanco, L., Bernad, A., Lázaro, J. M., Martín, G., Garmendia, C., & Salas, M. (1989). Highly Efficient DNA Synthesis by the Phage ϕ 29 DNA Polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 264(15), 8935–8940. doi:10.1016/s0021-9258(18)81883-x

Bustamante, C. (2008). In *singulo* Biochemistry: When Less Is More. *Annual Review of Biochemistry*, 77(1), 45–50. doi:10.1146/annurev.biochem.012108.120952

Casey, J., & Davidson, N. (1977). Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide. *Nucleic Acids Research*, 4(5), 1539–1552. doi:10.1093/nar/4.5.1539

Chang, K.-C. (2012). Revealing -1 Programmed Ribosomal Frameshifting Mechanisms by Single-Molecule Techniques and Computational Methods. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2012, 1–9. doi:10.1155/2012/569870

Chaw, S.-M., Tai, J.-H., Chen, S.-L., Hsieh, C.-H., Chang, S.-Y., Yeh, S.-H., Wang, H.-Y. (2020). The origin and underlying driving forces of the SARS-CoV-2 outbreak. *Journal of Biomedical Science*, 27(1). doi:10.1186/s12929-020-00665-8

Chen, J., Petrov, A., Johansson, M., Tsai, A., O’Leary, S. E., & Puglisi, J. D. (2014). Dynamic pathways of -1 translational frameshifting. *Nature*, 512(7514), 328–332. doi:10.1038/nature13428

Dahl, J. M., Lieberman, K. R., & Wang, H. (2016). Modulation of DNA Polymerase Noncovalent Kinetic Transitions by Divalent Cations. *Journal of Biological Chemistry*, 291(12), 6456–6470. doi:10.1074/jbc.m115.701797

Dillingham, M. S., & Kowalczykowski, S. C. (2008). RecBCD Enzyme and the Repair of Double-Stranded DNA Breaks. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 642–671. doi:10.1128/mubr.00020-08

Eichler, D. C., & Lehman, I. R. (1977). On the role of ATP in phosphodiester bond hydrolysis catalyzed by the recBC deoxyribonuclease of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 252(2), 499–503. doi:10.1016/s0021-9258(17)32744-8

Frieden, M., Hansen, H. F., & Koch, T. (2003). Nuclease Stability of LNA Oligonucleotides and LNA-DNA Chimeras. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 22(5-8), 1041–1043. doi:10.1081/ncn-120022731

Garmendia, C., Bernad, A., Esteban, J. A., Blanco, L., & Salas, M. (1992). The bacteriophage phi 29 DNA polymerase, a proofreading enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 267(4), 2594–2599. doi:10.1016/s0021-9258(18)45922-4

Gupta, A., Mishra, A., & Puri, N. (2017). Peptide nucleic acids: Advanced tools for

biomedical applications. *Journal of Biotechnology*, 259, 148–159.
doi:10.1016/j.jbiotec.2017.07.026

Jacks, T., Madhani, H. D., Masiarz, F. R., & Varmus, H. E. (1988). Signals for ribosomal frameshifting in the rous sarcoma virus gag-pol region. *Cell*, 55(3), 447–458. doi:10.1016/0092-8674(88)90031-1

Jacobsen, H., Klenow, H., & Overgaard-Hansen, K. (1974). The N-Terminal Amino-Acid Sequences of DNA Polymerase I from *Escherichia coli* and of the Large and the Small Fragments Obtained by a Limited Proteolysis. *European Journal of Biochemistry*, 45(2), 623–627. doi:10.1111/j.1432-1033.1974.tb03588.x

Karkas, J. D. (1973). Reverse Transcription by *Escherichia coli* DNA Polymerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12), 3834–3838.
doi:10.1073/pnas.70.12.3834

Kelly, J. A., Olson, A. N., Neupane, K., Munshi, S., Emeterio, J. S., Pollack, L., Woodside, M. T., & Dinman, J. D. (2020). Structural and functional conservation of the programmed -1 ribosomal frameshift signal of SARS-CoV-2. *bioRxiv* : the preprint server for biology, 2020.03.13.991083. doi:10.1101/2020.03.13.99108

Klenow, H. & Henningsen, I. (1970). Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 65(1):168-75. doi: 10.1073/pnas.65.1.168.

Matsumoto, S., & Hammes, G. G. (1975). Fluorescence energy transfer between ligand binding sites on aspartate transcarbamylase. *Biochemistry*, 14(2), 214–224. doi:10.1021/bi00673a004

Merchant, K. A., Best, R. B., Louis, J. M., Gopich, I. V., & Eaton, W. A. (2007). Characterizing the unfolded states of proteins using single-molecule FRET spectroscopy and molecular simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(5), 1528–1533. doi:10.1073/pnas.0607097104

Napthine, S., Ling, R., Finch, L. K., Jones, J. D., Bell, S., Brierley, I., & Firth, A. E. (2017). Protein-directed ribosomal frameshifting temporally regulates gene expression. *Nature Communications*, 8, 15582. doi:10.1038/ncomms15582

Neupane, K., Zhao, M., Lyons, A., Munshi, S., Ileperuma, S. M., Ritchie, D. B., ...

Woodside, M. T. (2021). Structural dynamics of single SARS-CoV-2 pseudoknot molecules reveal topologically distinct conformers. *Nature Communications*, 12(1). doi:10.1038/s41467-021-25085-6

Periasamy, A. (2001). Fluorescence resonance energy transfer microscopy: a mini review. *Journal of Biomedical Optics*, 6(3), 287. doi:10.1117/1.1383063

Piston, D. W., & Kremers, G.-J. (2007). Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(9), 407–414. doi:10.1016/j.tibs.2007.08.003

Ray, P. C., Fan, Z., Crouch, R. A., Sinha, S. S., & Pramanik, A. (2014). Nanoscopic optical rulers beyond the FRET distance limit: fundamentals and applications. *Chem. Soc. Rev.*, 43(17), 6370–6404. doi:10.1039/c3cs60476d

Ricchetti, M., & Buc, H. (1993). E. coli DNA polymerase I as a reverse transcriptase. *The EMBO journal*, 12(2), 387–396. doi:10.1002/j.1460-2075.1993.tb05670.x.

Roman, C., Lewicka, A., Koirala, D., Li, N.-S., & Piccirilli, J. A. (2021). The SARS-CoV-2 Programmed –1 Ribosomal Frameshifting Element Crystal Structure Solved to 2.09 Å Using Chaperone-Assisted RNA Crystallography. *ACS Chemical Biology*, 16(8), 1469–1481. doi:10.1021/acscchembio.1c00324

Rosamond, J., Telander, K. M., & Linn, S. (1979). Modulation of the action of the recBC enzyme of Escherichia coli K-12 by Ca²⁺. *Journal of Biological Chemistry*, 254(17), 8646–8652. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)86941-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)86941-7)

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (2nd ed.), 5.40-5.43. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463

Schurer, H. (2002). A universal method to produce in vitro transcripts with homogeneous 3' ends. *Nucleic Acids Research*, 30(12), 56e–56. doi:10.1093/nar/gnf055

Stahl, G., McCarty, G. P., & Farabaugh, P. J. (2002). Ribosome structure: revisiting the connection between translational accuracy and unconventional decoding. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(4), 178–183. doi:10.1016/s0968-0004(02)02064-9

Sun, Y., Abriola, L., Niederer, R. O., Pedersen, S. F., Alfajaro, M. M., Silva Monteiro, V., Wilen, C. B., Ho, Y. C., Gilbert, W. V., Surovtseva, Y. V., Lindenbach, B. D., & Guo, J. U. (2021). Restriction of SARS-CoV-2 replication by targeting programmed -1 ribosomal frameshifting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(26), e2023051118. doi:10.1073/pnas.2023051118

Taylor, A. F., & Smith, G. R. (2003). RecBCD enzyme is a DNA helicase with fast and slow motors of opposite polarity. *Nature*, 423(6942), 889–893. doi:10.1038/nature01674

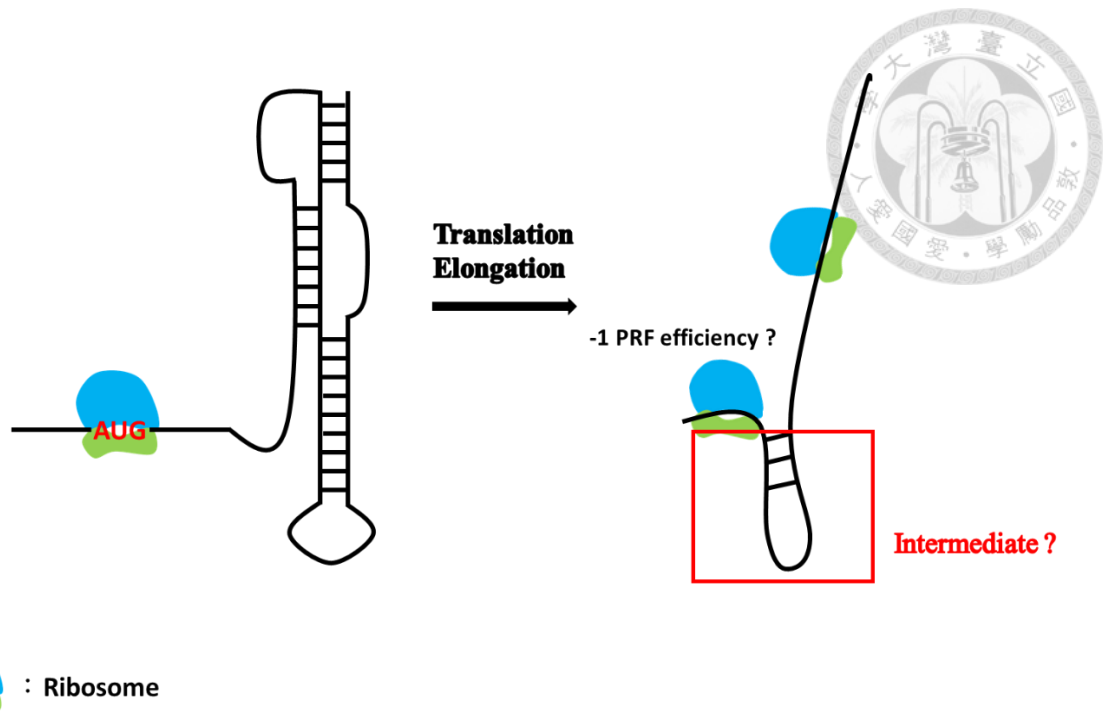
Taylor, A., & Smith, G. R. (1980). Unwinding and rewinding of DNA by the RecBC enzyme. *Cell*, 22(2), 447–457. doi:10.1016/0092-8674(80)90355-4

Truong, K., & Ikura, M. (2001). The use of FRET imaging microscopy to detect protein–protein interactions and protein conformational changes in vivo. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(5), 573–578. doi:10.1016/s0959-440x(00)00249-9

Wu, Y., Xing, D., Luo, S., Tang, Y., & Chen, Q. (2006). Detection of caspase-3 activation in single cells by fluorescence resonance energy transfer during photodynamic therapy induced apoptosis. *Cancer Letters*, 235(2), 239–247. doi:10.1016/j.canlet.2005.04.036

李翊廷學姊論文 Study of interaction between frameshift-stimulating mRNA pseudoknots and ribosomes by single-molecule FRET (2020)

杜睿芸學姊論文 Exploring how the ribosome affects frameshifting-stimulating pseudoknots by using optical tweezers (2020)




 : Ribosome

圖 1、核糖體轉譯過程中可能形成 intermediate 影響-1 PRF 效率

核糖體在轉譯 mRNA 時會由 5'→3' 解開 RNA 二級結構，並逐漸由 5' 端裸露出 RNA，此過程中 RNA 可能會形成 intermediate，進一步導致後續核糖體轉譯過程中-1 框架位移的效率受影響。

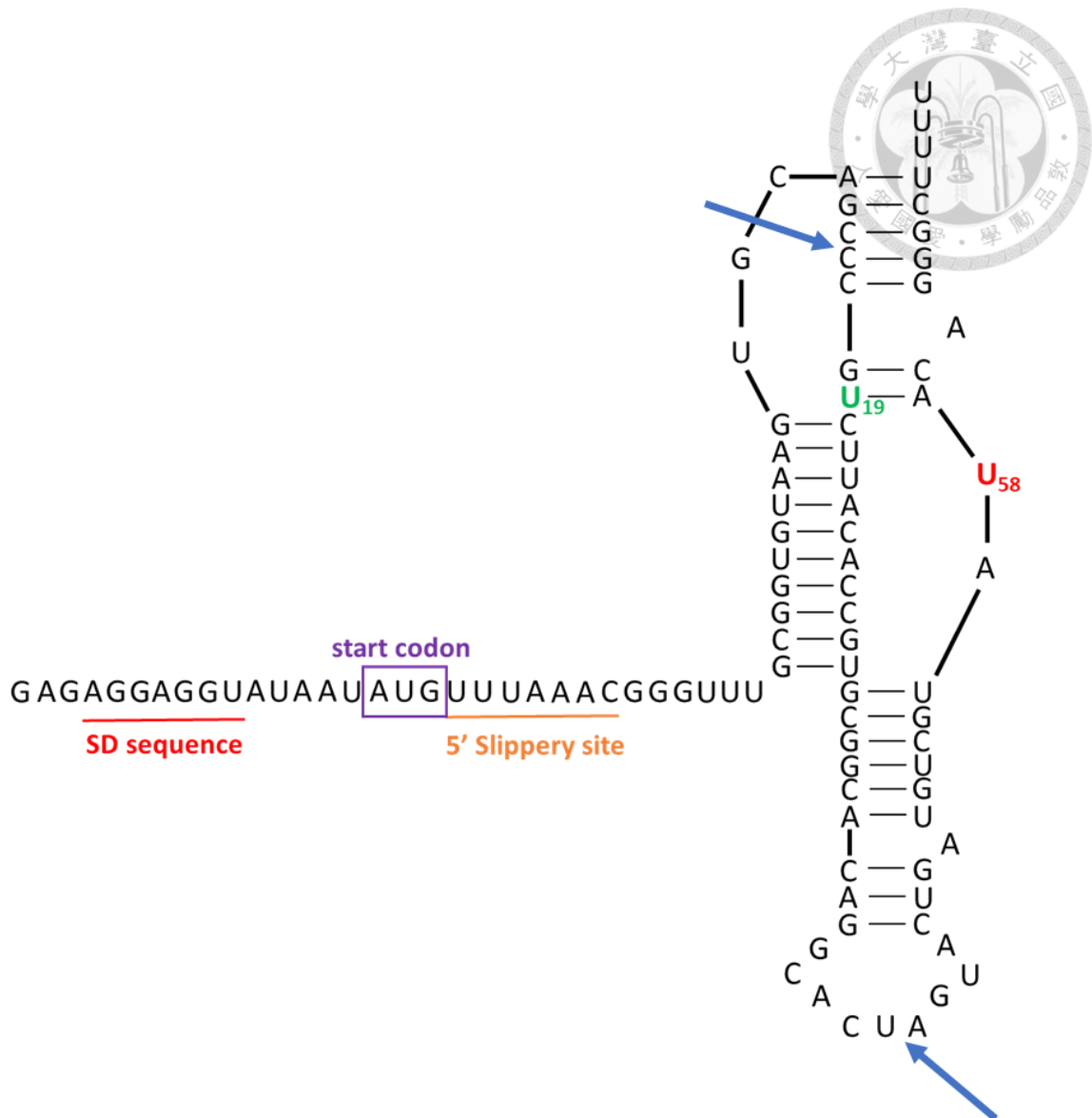


圖 2、SARS-CoV-2 full RNA construct

本實驗所使用的 RNA construct 由 SARS-CoV-2 偽結、滑動序列 UUUAAAC、起始密碼子(AUG)、SD 序列組成，其中 U19 及 U58 經 aminohexylacrylamino 修飾以供 Cy3、Cy5 標註。全長 RNA 是由 CoV2-UTR、CoV2u-Cy3、CoV2d-Cy5 進行 ligation 合成，箭頭處代表 ligation 的位置。

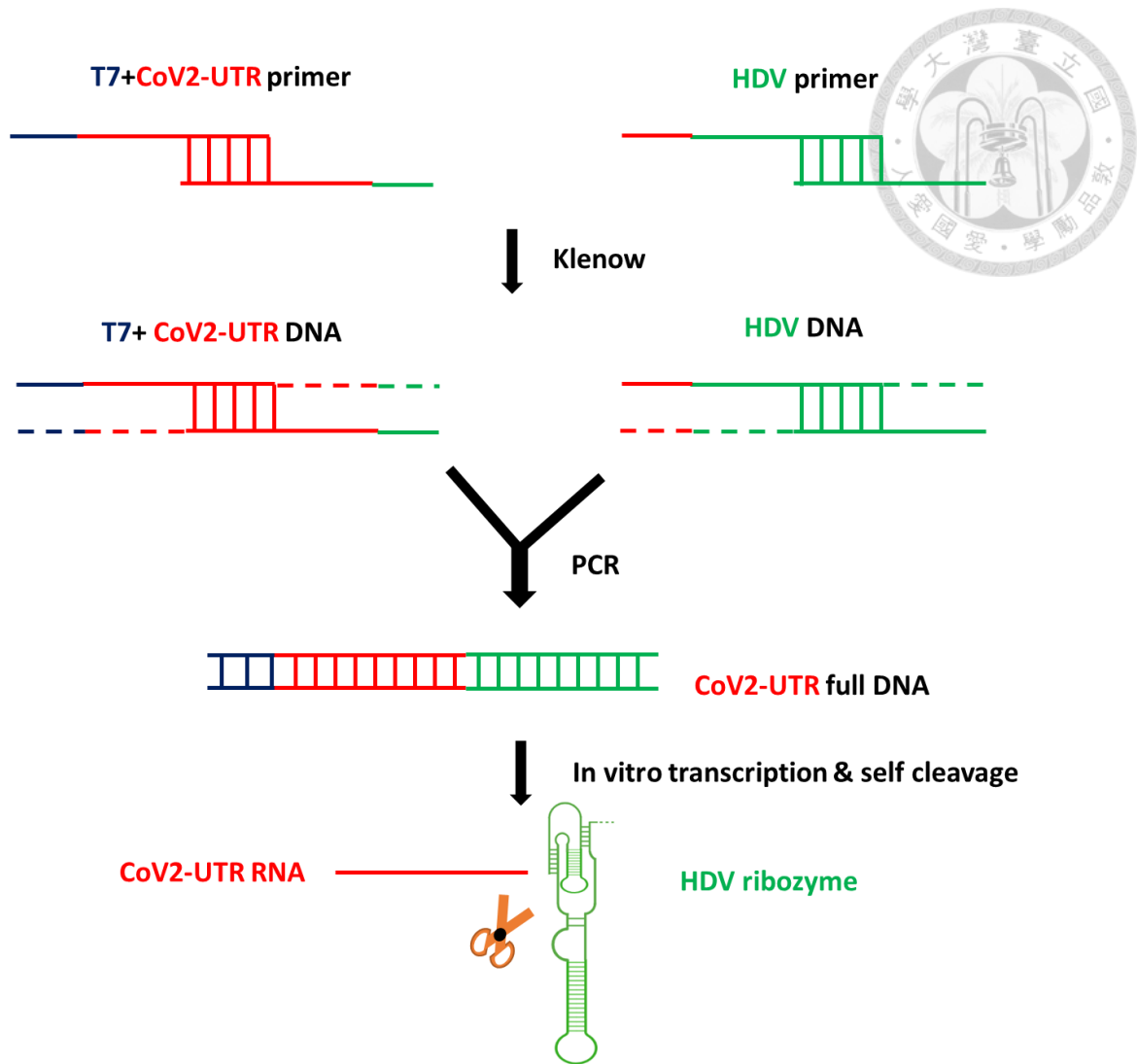


圖 3、HDV ribozyme 系統

利用 HDV ribozyme 自切的機制，使 CoV2-UTR 在轉錄後形成 homogenous 3' 端，以便後續與 CoV2u-Cy3 及 CoV2d-Cy5 進行 ligation。

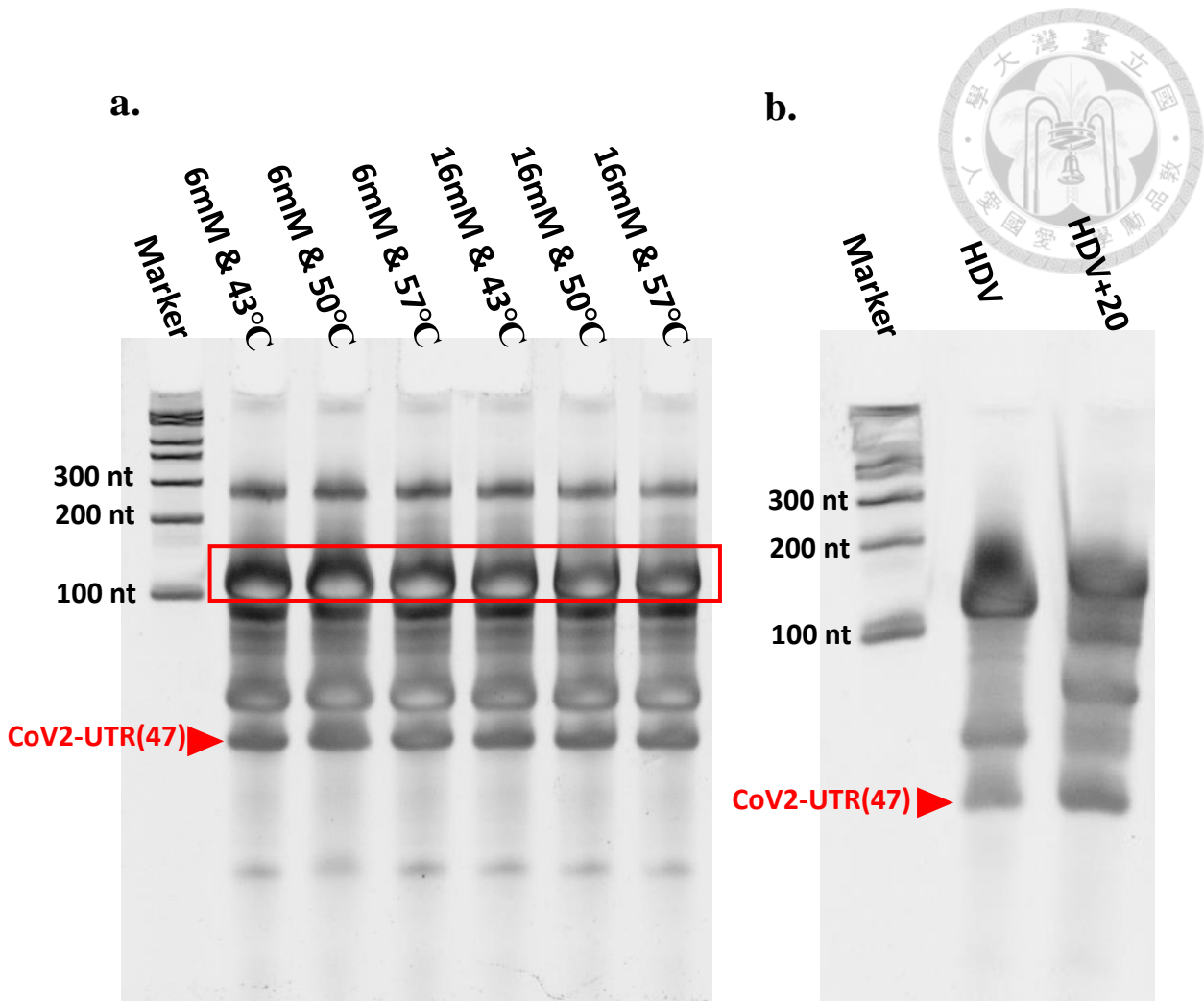


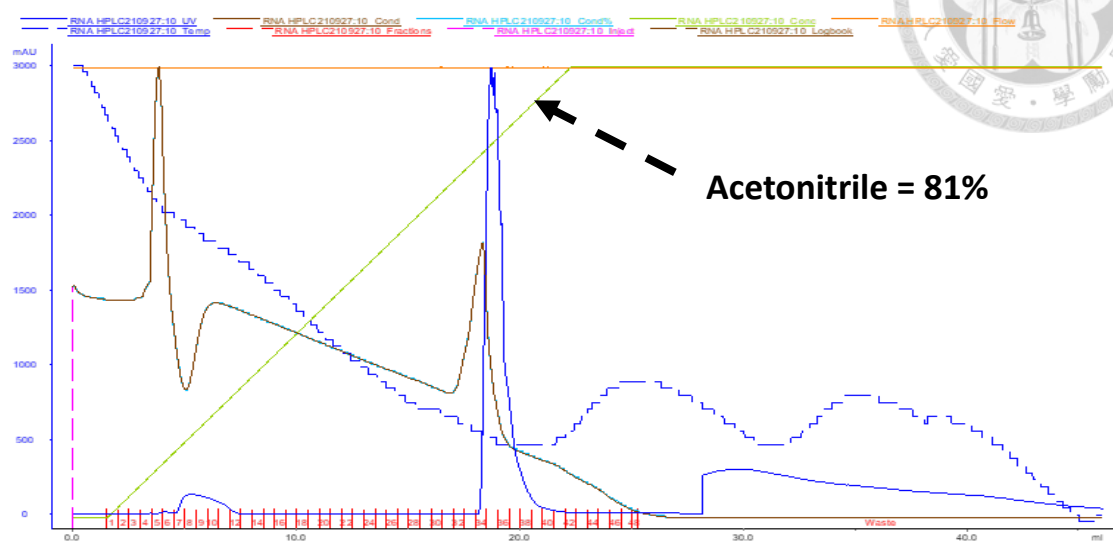
圖 4、HDV 自切效率比較

比較 CoV2-UTR 在轉錄後不同條件下 HDV ribozyme 自切的效率。a. 正常 HDV 序列分別在 Mg^{2+} 濃度 6 mM 或 16 mM 下以 43°C、50°C、57°C 於自切反應中進行摺疊，並取等量產物跑 10% denature urea PAGE；b. 比較正常 HDV 序列與額外延長 HDV 3'端 20 個鹼基於轉錄後的自切效率，紅框處為 HDV ribozyme 未自切的 CoV2-UTR-HDV 全長 RNA (Marker 使用 RiboRuler Low Range RNA Ladder)。

(Date from 2021/10/20)



a.



b.

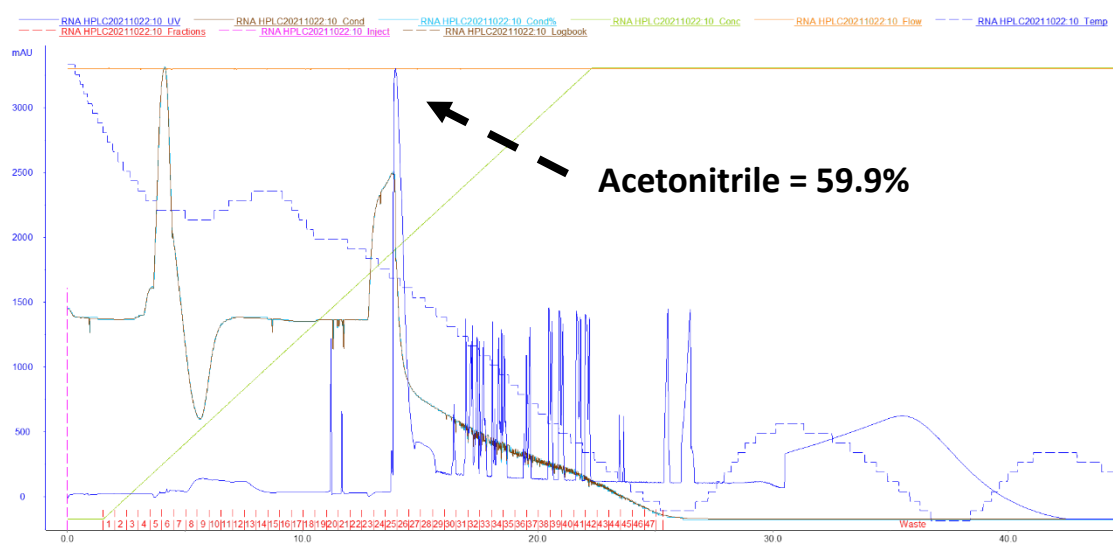


圖 5、RNA-dye FPLC 純化

a. CoV2u-Cy3；b. CoV2d-Cy5 分別在 dye label 後，通過 C8 column 之 FPLC 結果圖（其中深藍線代表在 254 nm 下的 UV 值；綠線代表 acetonitrile 濃度百分比）。由 UV 圖得知，CoV2u-Cy3 會在 acetonitrile = 81%、CoV2d-Cy5 於 acetonitrile = 59.9% 流出。

(Date from 2021/9/27 & 2021/10/22)

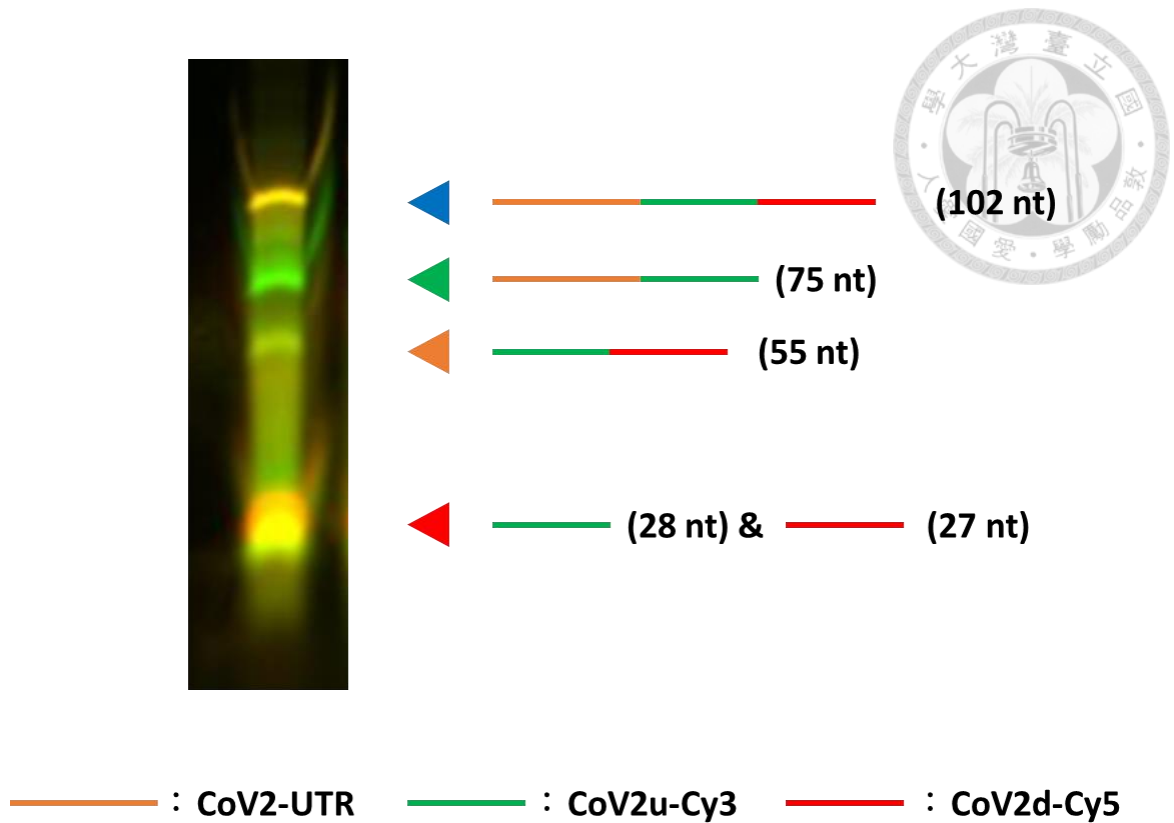


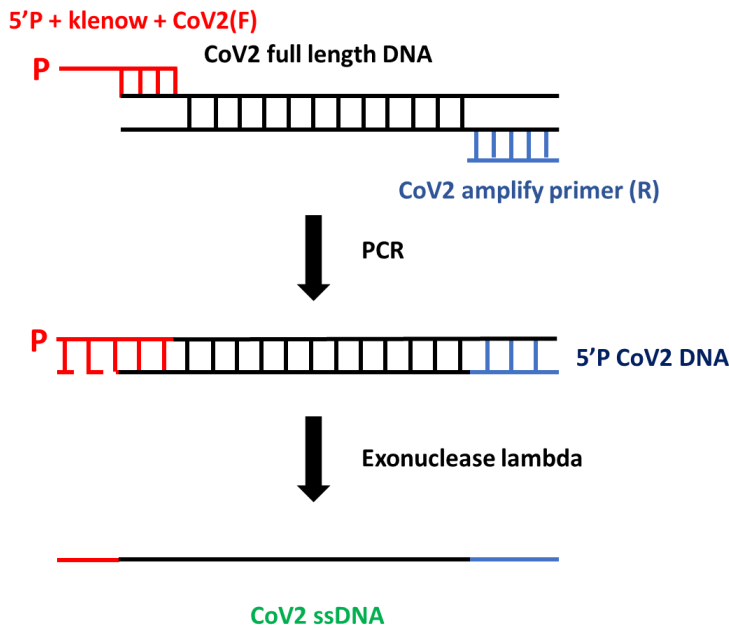
圖 6、SARS-CoV-2 接合產物

SARS-CoV-2 接合產物經 10% urea PAGE 分離不同 RNA 片段，CoV2-UTR (47nt)、CoV2u-Cy3 (28nt)、CoV2d-Cy5 (27nt) 由於與 DNA splint 黏合的不全進而形成不同長度的 RNA 片段。

(Date from 2021/11/4)



a.



b.

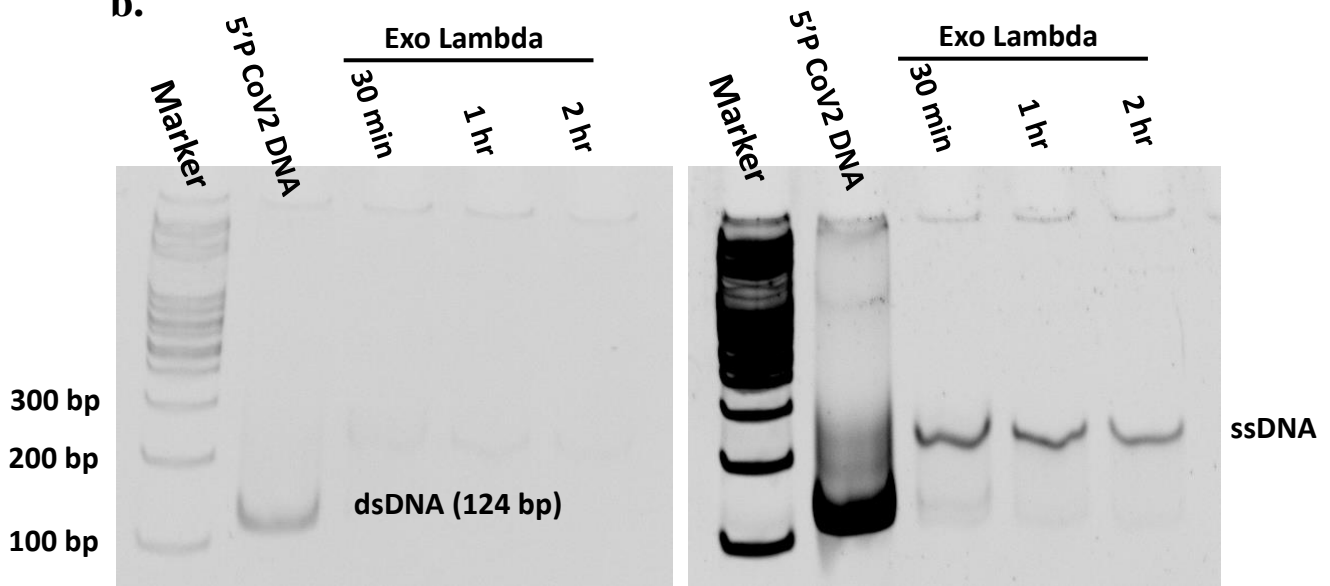


圖 7、CoV2 ssDNA 的製備

a. 使用 5'P + klenow + CoV2 (F)與 CoV2 full length amplify (R)與 CoV2 5'AGA DNA 進行 PCR，做出一股帶有磷酸根之 DNA，Exonuclease lambda 會辨認 5'磷酸根並消化掉該股；b. Exonuclease lambda 分別作用 30 分鐘、1 小時及 2 小時所形成的 ssDNA 在 10% native PAGE 下呈現結果，左圖使用 novel juice 作

為 loading dye，能染出雙股結構；右圖經 SYBR GREEN II 複染以辨別單股 DNA。

(Marker 使用 One MARK 100)

(Date from 2021/12/2)



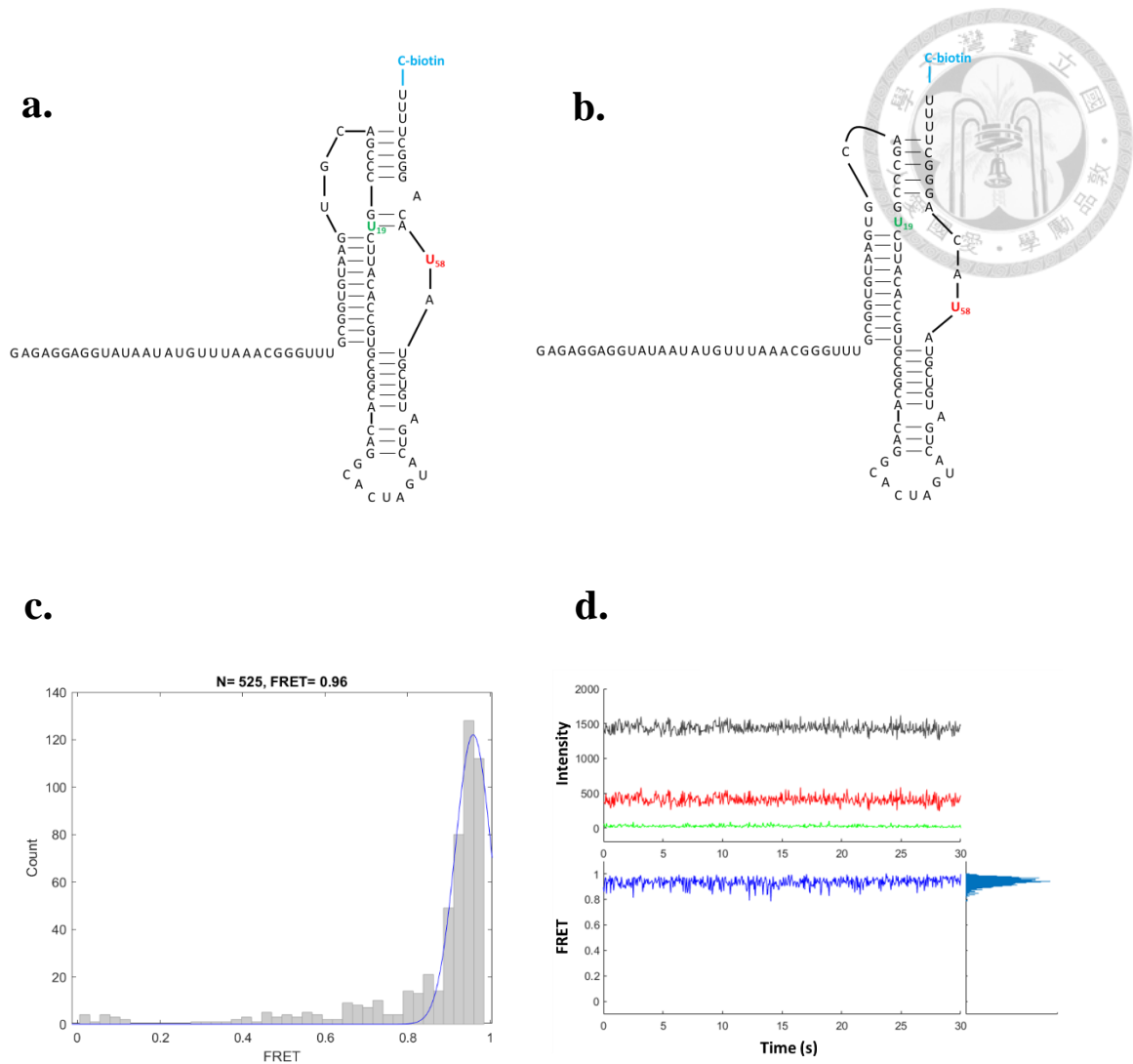


圖 8、SARS-CoV-2 偽結結構、FRET 值分布與 FRET 隨時間變化圖

a. SARS-CoV-2 偽結二級結構預測圖，其中 biotin 透過 ligation 的方式將 Cytidine-biotin label 在 3'端；b. SARS-CoV-2 偽結之晶體結構；c. SARS-CoV-2 偽結 FRET 值分布圖，經高斯函數分析顯示主要族群分布在 0.96；d. SARS-CoV-2 偽結在 30 秒內 FRET 值隨時間變化，多數分子 FRET 值穩定維持在 0.96。

(Date from 2022/5/20)

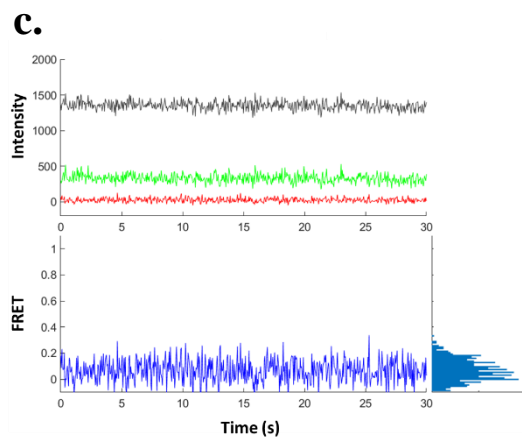
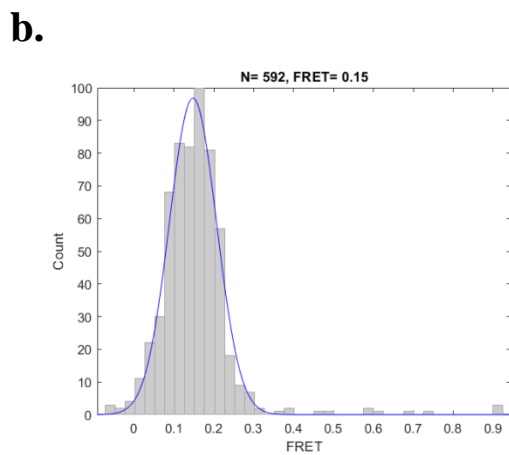
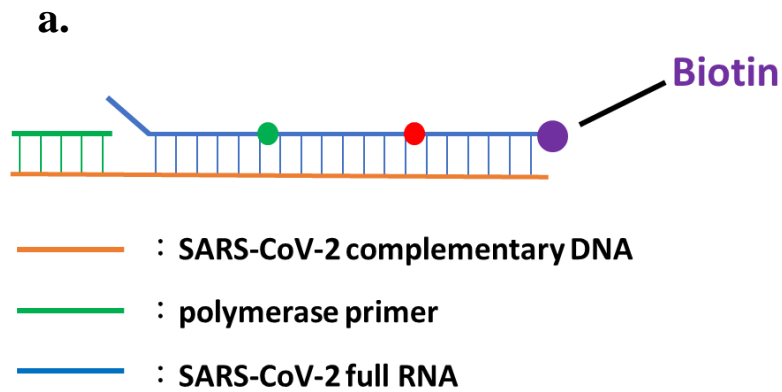


圖 9、SARS-CoV-2/ DNA hybrid 結構、FRET 值分布與 FRET 隨時間變化圖

a. SARS-CoV-2/ DNA 結構意象圖，其中 SARS-CoV-2 RNA 在 5'端有 3 個鹼基不與 DNA 互補形成 5'overhang RNA 與 gap；b. SARS-CoV-2/ DNA FRET 值分布圖，經高斯函數分析顯示主要族群分布在 0.15；c. SARS-CoV-2/ DNA 在 30 秒內 FRET 值隨時間變化，多數分子 FRET 值穩定維持在 0.15。

(Date from 2022/6/8)

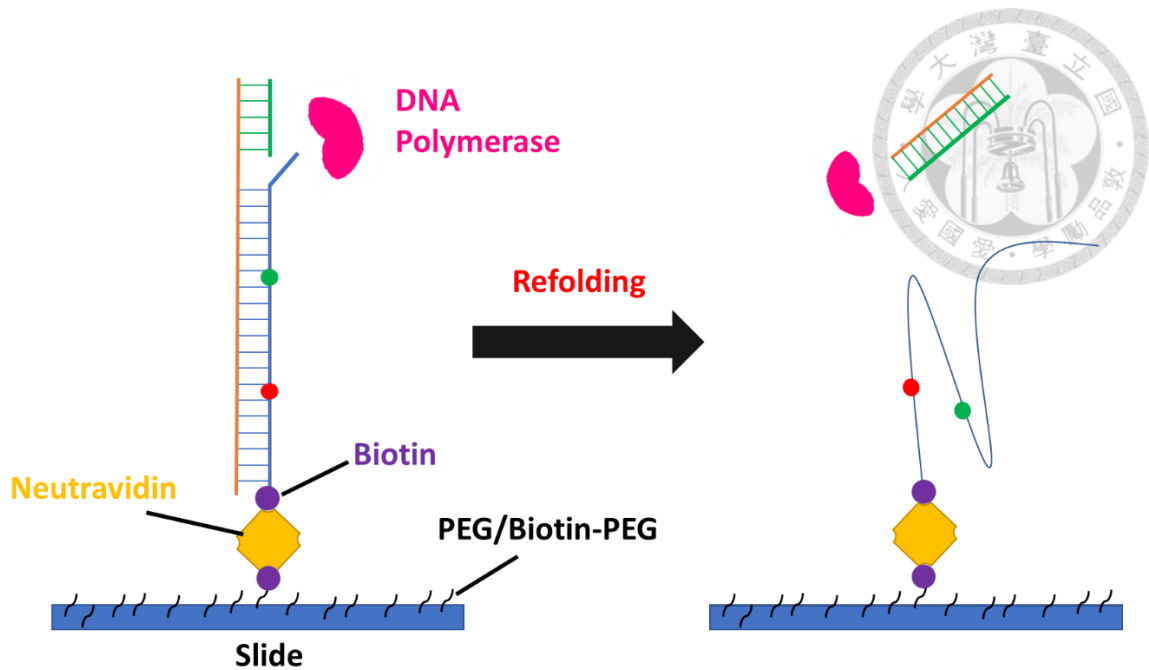


圖 10、SARS-CoV-2 再摺疊實驗設計 (聚合酶)

透過 Neutravidin 與 biotin 的作用將 SARS-CoV-2 hybrid-polymerase primer 固定在 slide 上，利用 DNA 聚合酶從 RNA 5' 端的 polymerase primer 聚合 DNA 使 RNA 由 5'→3' 與互補 DNA 分離，並觀察期間的 FRET 值變化。

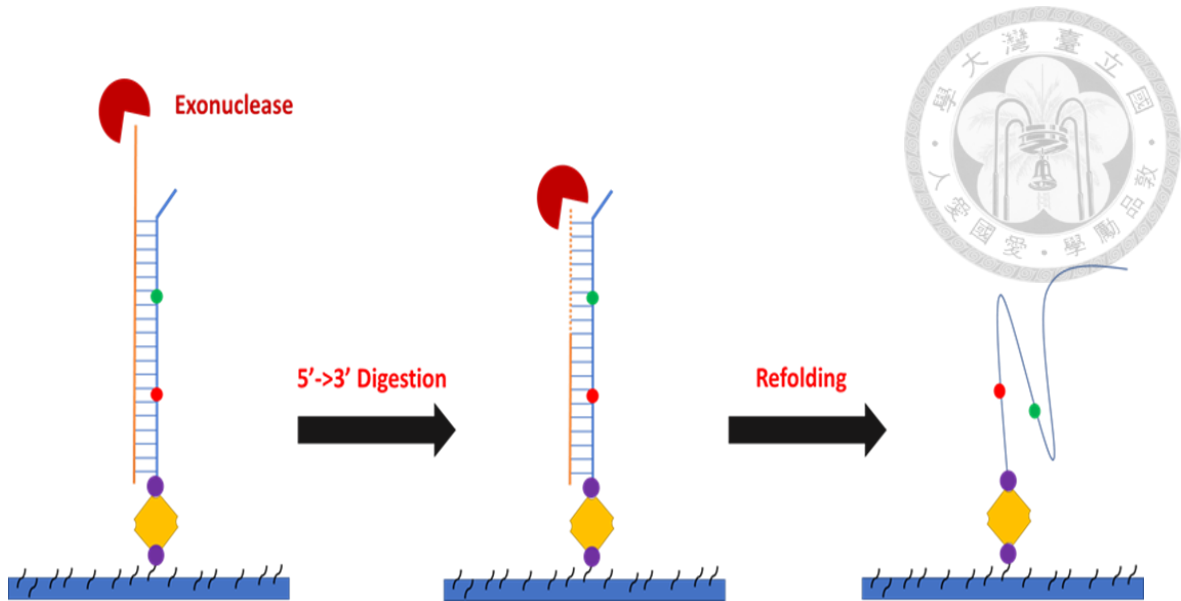
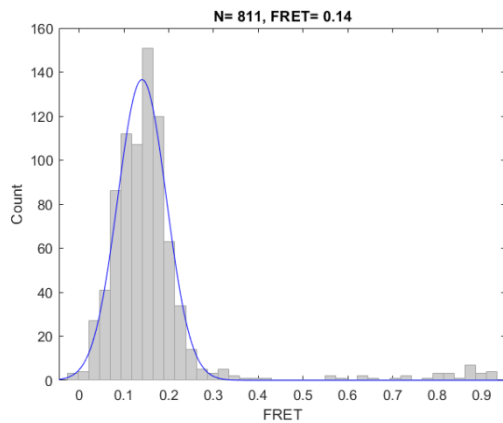


圖 11、SARS-CoV-2 再摺疊實驗設計 (外切酶)

使用 DNA 外切酶自 5'端開始水解 DNA，使 SARS-CoV-2 RNA 自 5'->3'重新再摺疊，並觀察期間的 FRET 值變化。

a.



b.

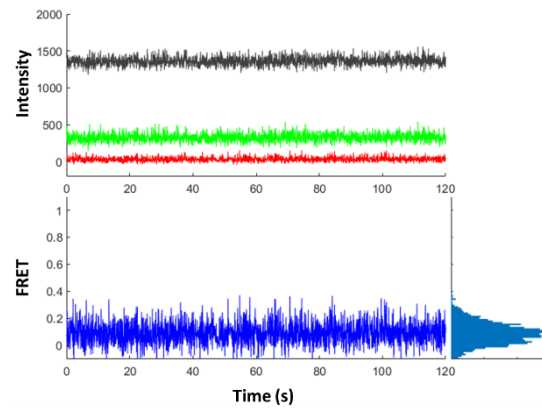
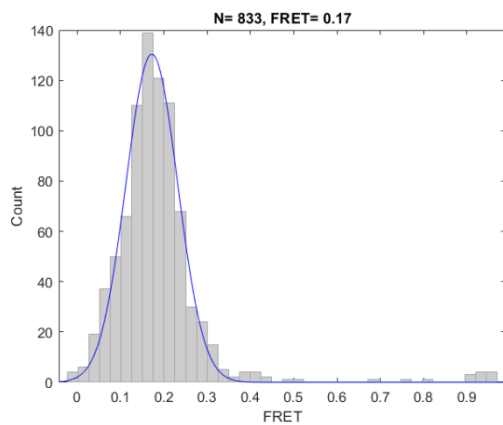


圖 12、經 Klenow Fragment + 0.2 mM dNTPs treatment SARS-CoV-2 RNA FRET 值分布與 FRET 隨時間變化圖

a. SARS-CoV-2 RNA 在 0.2 mM dNTPs + 0.1 U/ μ L Klenow Fragment 反應 15 分鐘後 FRET 值的分布圖，經高斯函數分析顯示主要族群分布在 0.14；b. 在 0.2 mM dNTPs + 0.1 U/ μ L Klenow Fragment 加入後 2 分鐘內多數分子 FRET 隨時間變化呈穩定 low FRET (0.14)，無明顯 FRET 值的變化。

(Date from 2022/5/28)

a.



b.

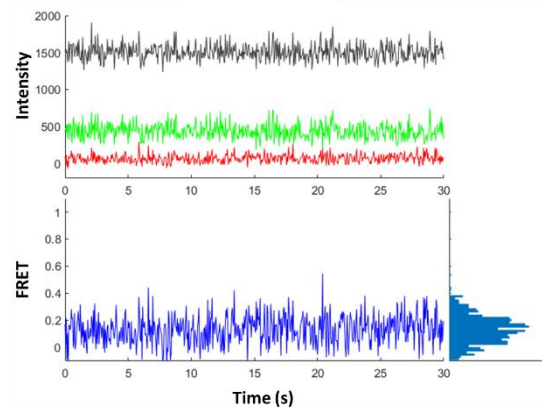


圖 13、SARS-CoV-2 RNA 在 Exonuclease V 無 ATP 作用之 FRET 分布與隨時間變化圖

將 SARS-CoV-2 RNA 以 0.2 U/ μ L Exonuclease V (無 ATP 參與)反應 15 分鐘後洗掉並於 42°C 加熱穩定，a. FRET 值分布經高斯函數分析顯示主要族群分布在 0.17；b. 多數分子 FRET 隨時間變化呈穩定 low FRET (0.17)。

(Date from 2022/6/8)

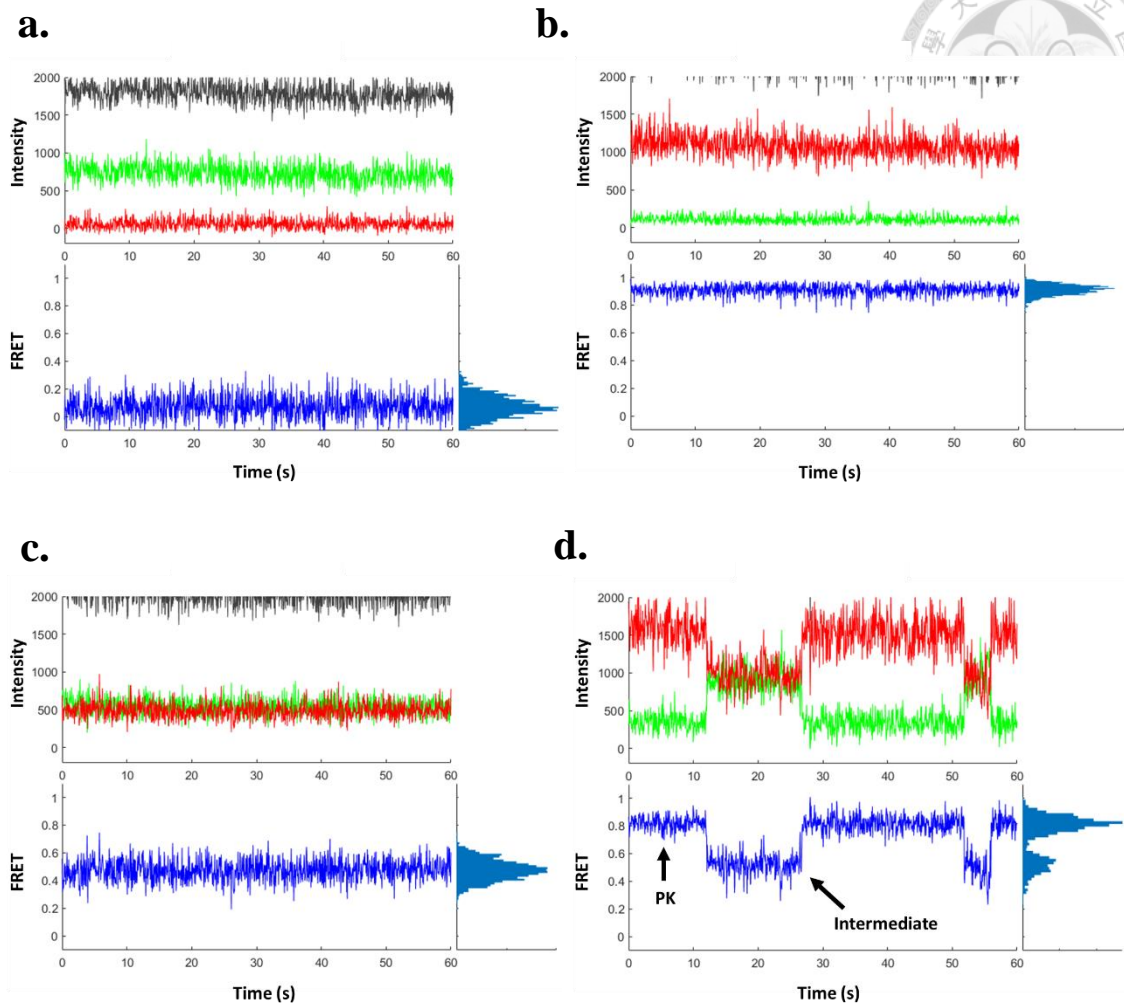
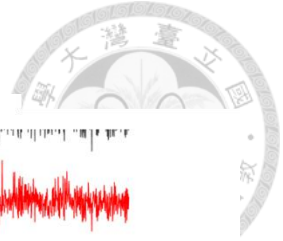


圖 14、經 Exonuclease V + 1 mM ATP treatment SARS-CoV-2 RNA FRET 隨時間變化圖

在 0.2 U/ μ L Exonuclease V + 1 mM ATP 處理下 SARS-CoV-2 RNA FRET 隨時間變化具以下幾種狀態：a. 穩定 low FRET (FRET < 0.2)，即 hybrid 態 (49%)；b. 穩定 high FRET (FRET > 0.8)，即偽結態 (23%)；c. 穩定 middle FRET (0.2 < FRET < 0.8)，為 Exonuclease V 催化後較不穩定的中間態 (8%)；d. SARS-CoV-2 RNA 在 Exonuclease V 催化過程中呈現的動態變化 (19%)。

(Date from 2022/6/8)

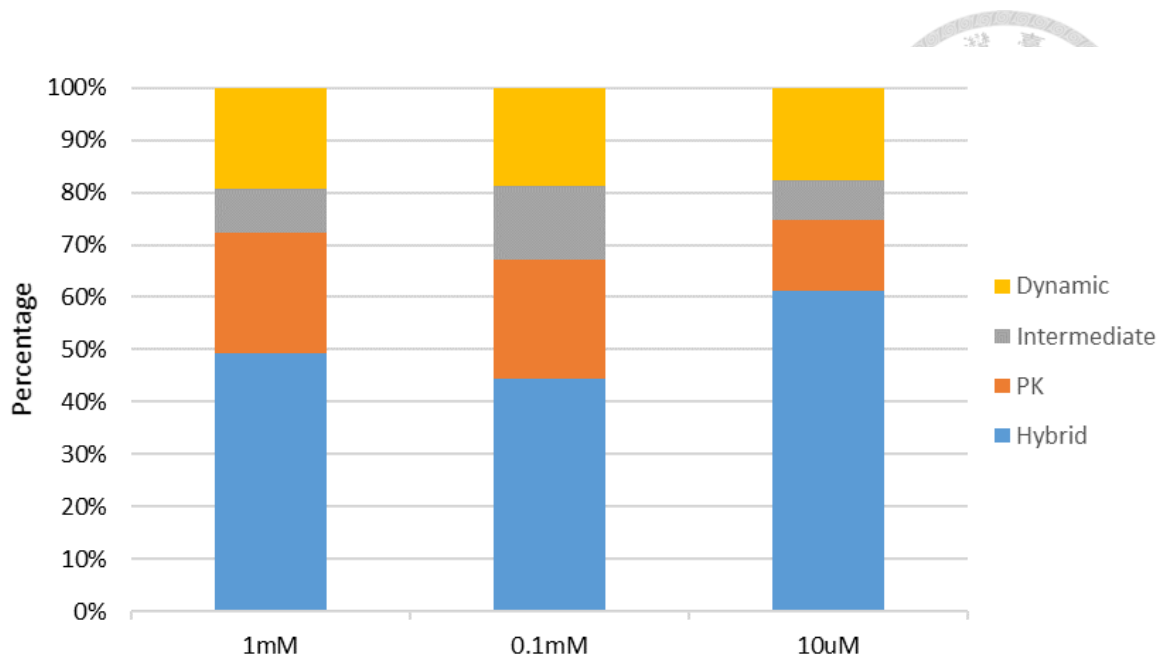


圖 15、在 Exonuclease V 與不同 ATP 濃度作用當下 SARS-CoV-2 RNA 不同構型的比例

SARS-CoV-2/DNA hybrid 經 0.2 U/ μ L Exonuclease V 及分別 1 mM、0.1 mM、10 μ M 三種 ATP 濃度作用下 SARS-CoV-2 RNA 構型主要可以分類為 4 種：RNA-DNA hybrid (藍色)、偽結(PK, 橘色)、中間態(灰色)、動態變化(黃色)。其中顯示 hybrid 與 PK 比例在 1 mM 及 0.1 mM ATP 下無明顯變化；在 10 μ M ATP 下 PK 比例會下降 hybrid 比例會上升，代表 Exonuclease V 作用受 ATP 濃度影響。然而，無論 ATP 濃度高低，呈動態變化的比例皆無明顯改變，維持在約 18%。

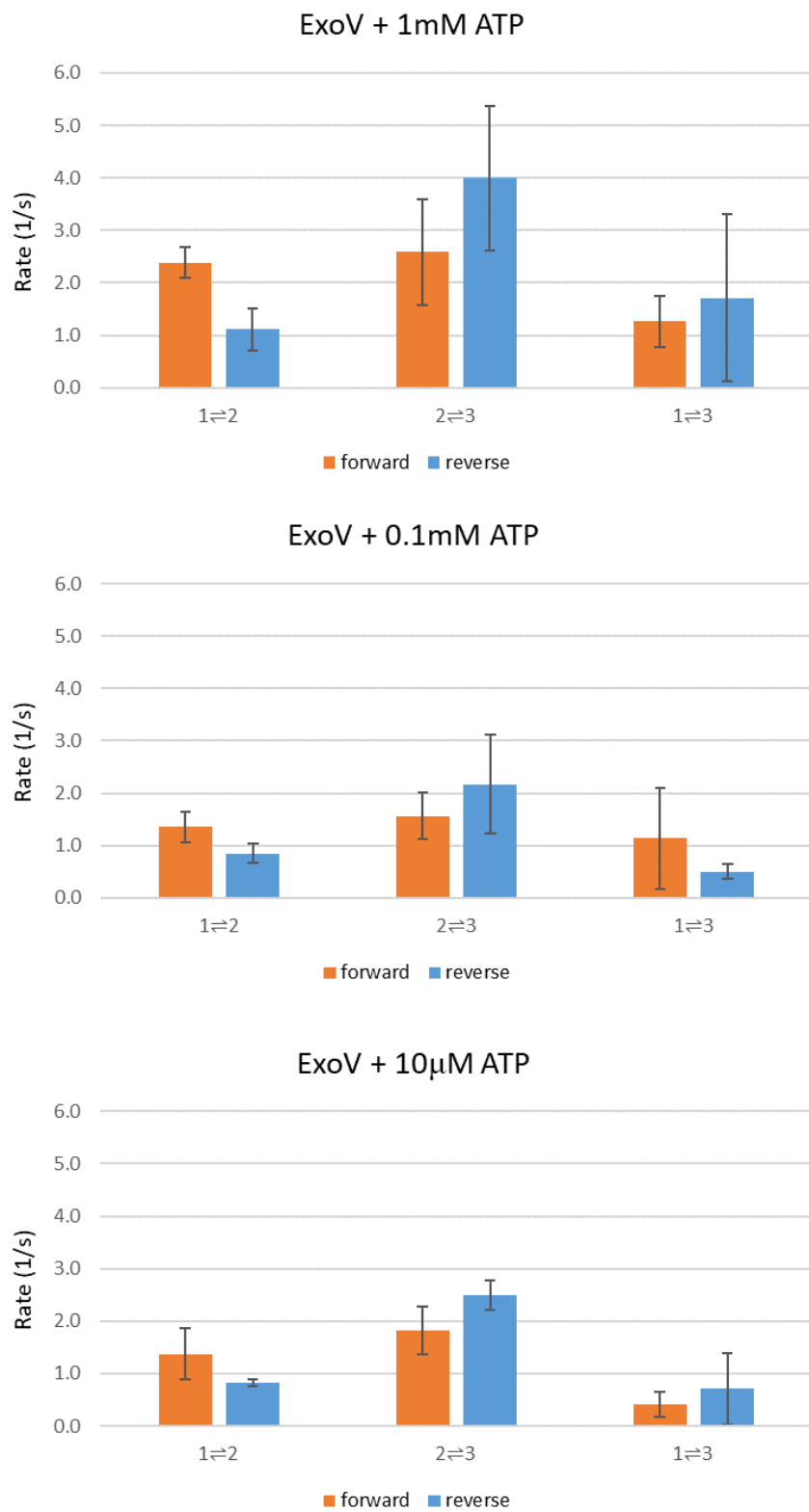


圖 16、在 Exonuclease V 與不同 ATP 濃度作用當下 SARS-CoV-2 RNA 動態轉換速率比較

SARS-CoV-2 RNA 在 0.2 U/ μ L Exonuclease V 與濃度不同之 ATP 存在下在各個狀態轉換的速率，其中 State 1 代表 hybrid、State 2 代表 intermediate、State 3 代表 PK；橘色代表由 low FRET 轉向 high FRET (forward)、藍色代表由 high FRET 轉向 low FRET (reverse)。無論 ATP 濃度高低，SARS-CoV-2 RNA 皆傾向由 State1 \rightarrow State 2；State 2 及 State 3 之間的轉換速率皆相對其他狀態間的轉換速率高，為兩狀態間的不穩定，造成 RNA 在兩狀態間快速的轉換；State 1 與 State 3 在這些條件下則看不出明顯規律。

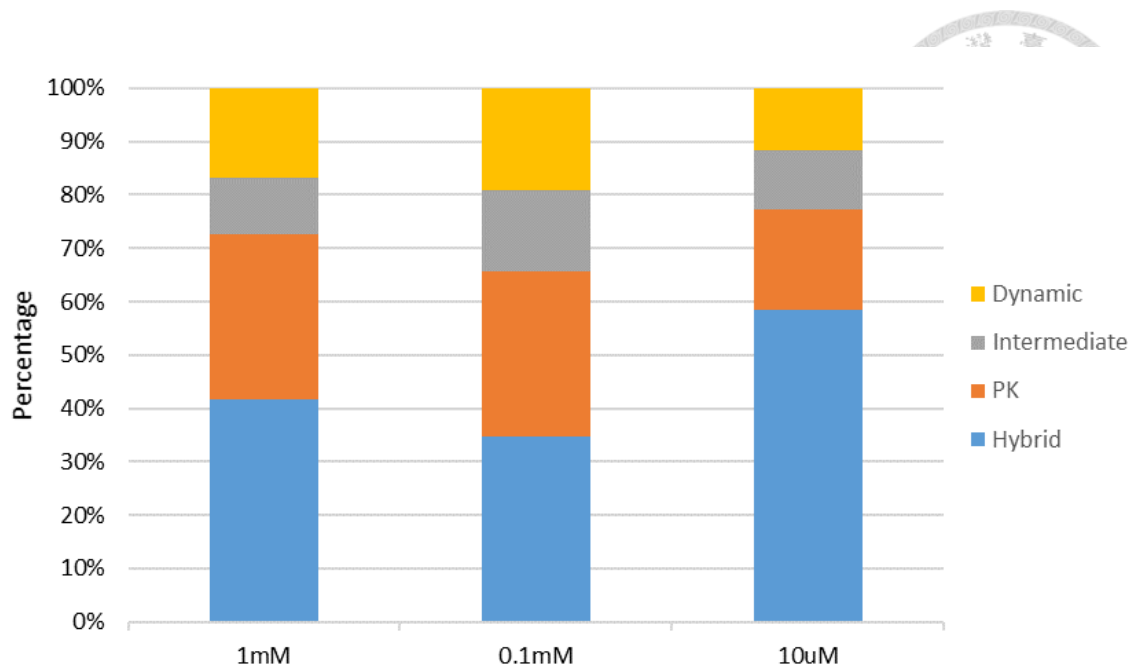


圖 17、在 Exonuclease V 與不同 ATP 濃度作用後 SARS-CoV-2 RNA 不同構型的比例

SARS-CoV-2/DNA hybrid 在 0.2 U/ μ L Exonuclease V 與濃度不同之 ATP 作用 15 分鐘後將 Exonuclease V 與 ATP 沖掉，使環境內不存在 enzyme 及 ATP 下 SARS-CoV-2 RNA 構型主要可以分類為 4 種：RNA-DNA Hybrid (藍色)、偽結(PK, 橘色)、intermediate (灰色)、動態變化(黃色)。其中 0.1 mM ATP 組 dynamic 與 intermediate 的比例相較於 1 mM 及 10 μ M 高，其餘比例與 Exonuclease V 作用當下的比例相似，1 mM 與 0.1 mM ATP 組具有相對於 10 μ M 組較高的偽結比例。

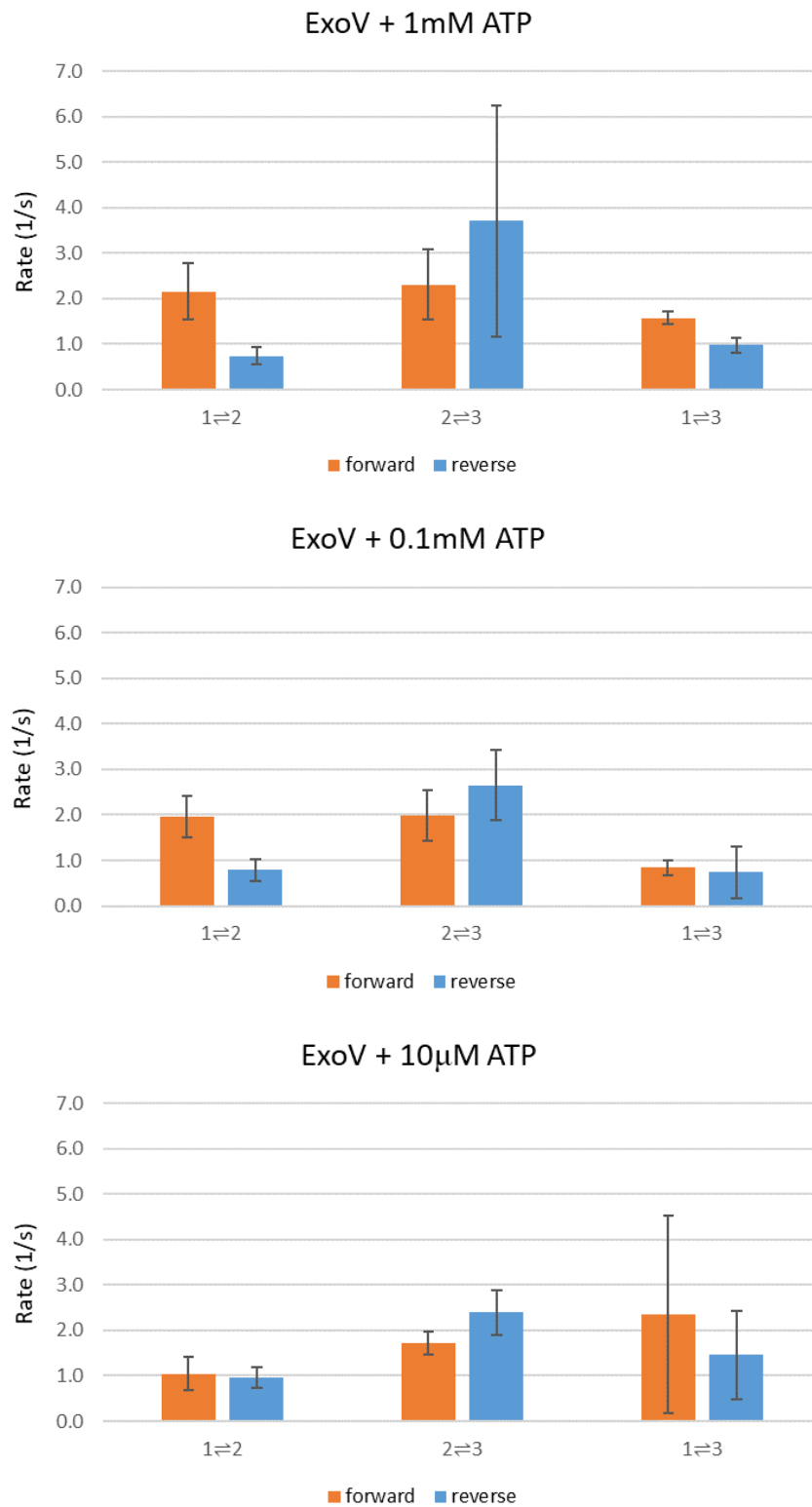



圖 18、在 Exonuclease V 與不同 ATP 濃度作用後 SARS-CoV-2 RNA 動態轉換速率比較(無 enzyme 及 ATP)



SARS-CoV-2 RNA 在 0.2 U/ μ L Exonuclease V 與濃度不同之 ATP 作用 15 分鐘後將 Exonuclease V 與 ATP 沖掉，環境內不存在 enzyme 及 ATP 下在各個狀態轉換的速率，其中 State 1 代表 hybrid、State 2 代表 intermediate、State 3 代表 PK；橘色代表由 low FRET 轉向 high FRET (forward)、藍色代表由 high FRET 轉向 low FRET (reverse)。無論 ATP 濃度高低，SARS-CoV-2 RNA 皆傾向由 State1 \rightarrow State 2；State 2 及 State 3 間在高 ATP 濃度下的轉換速率高，且無論 ATP 濃度更傾向由 State 3 \rightarrow State 2，顯示這些具動態變化的 SARS-CoV-2 RNA 無法穩定維持在偽結狀態，會在偽結與中間態間快速轉換；State 1 與 State 3 間在不存在 enzyme 及 ATP 干擾下，則傾向由 State1 \rightarrow State 3。

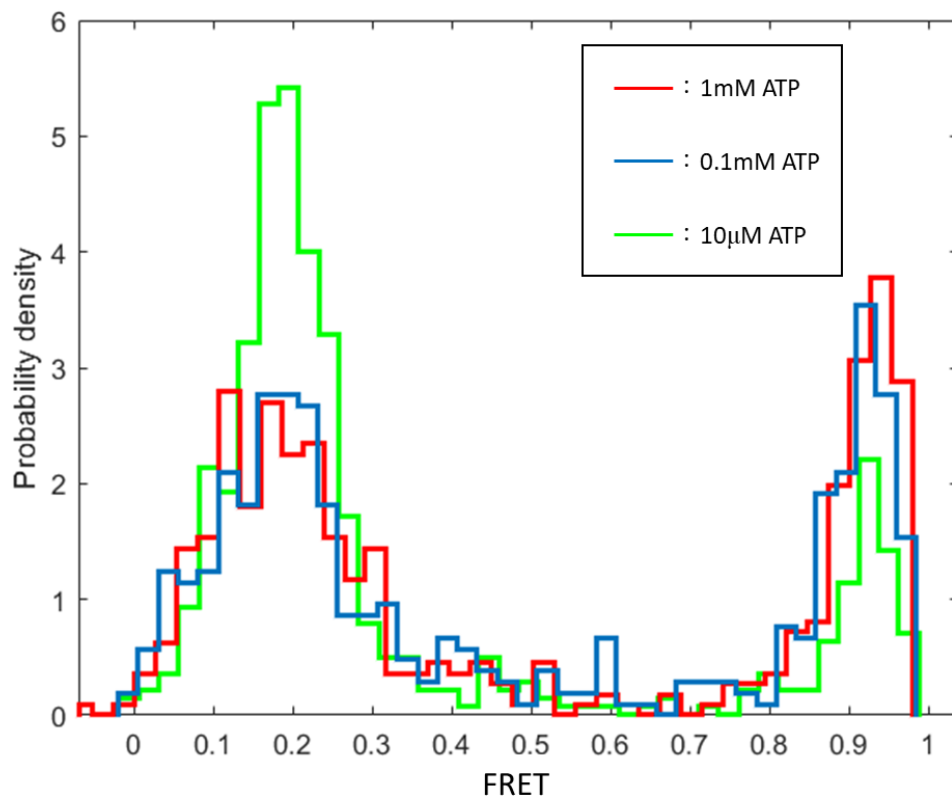


圖 19、SARS-CoV-2 RNA 經 Exonuclease V 與不同 ATP 濃度作用並穩定後 FRET 分布圖

SARS-CoV-2 RNA 在 0.2 U/ μ L Exonuclease V 及不同 ATP 濃度作用 15 分鐘後將 Exonuclease V 與 ATP 沖掉、並於 42°C 加熱 5 分鐘再降回室溫的 FRET 分布，縱軸為機率密度，橫軸為 FRET 值。10 μ M ATP 作用後僅有少部分分子從 hybrid (FRET = 0.186, 82%) 轉回偽結 (FRET = 0.927, 18%)；0.1 mM 與 1 mM ATP 作用後分布相似前者有 61% 維持在 hybrid (FRET = 0.178)，有 39% 轉回到偽結 (FRET = 0.923)；後者則是有 57% 維持在 hybrid (FRET = 0.178)，有 43% 回到偽結 (FRET = 0.939)。

(Date from 2022/6/8)

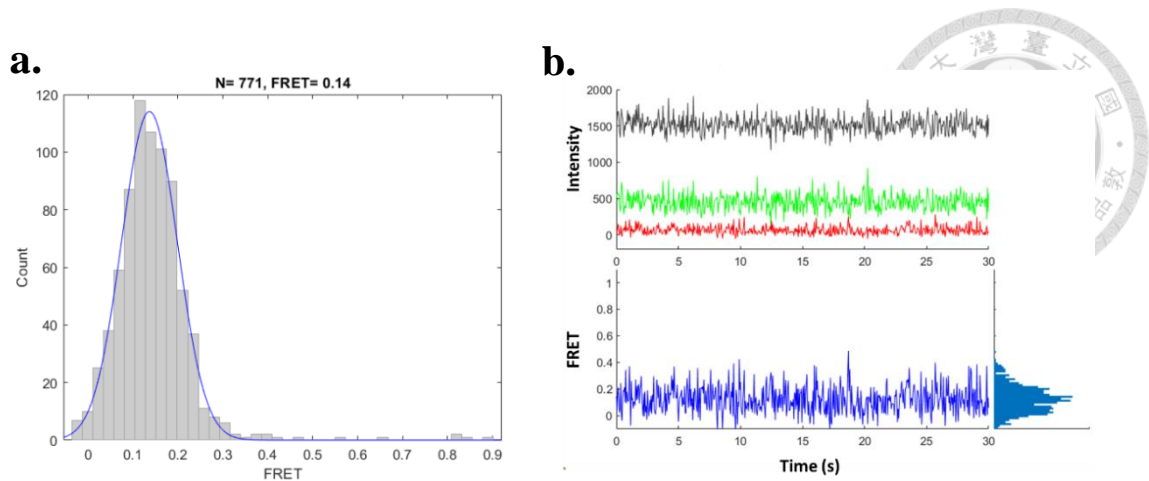


圖 20、SARS-CoV-2 RNA 在 phi29 DNA polymerase 無 dNTPs 作用之 FRET 分布與隨時間變化圖

將 SARS-CoV-2 RNA 以 0.16 U/ μ L Exonuclease V (無 dNTPs 參與)反應，a. FRET 值分布經高斯函數分析顯示主要族群分布在 0.14；b. 多數分子 FRET 隨時間變化呈穩定 low FRET (0.14)。

(Date from 2022/6/29)

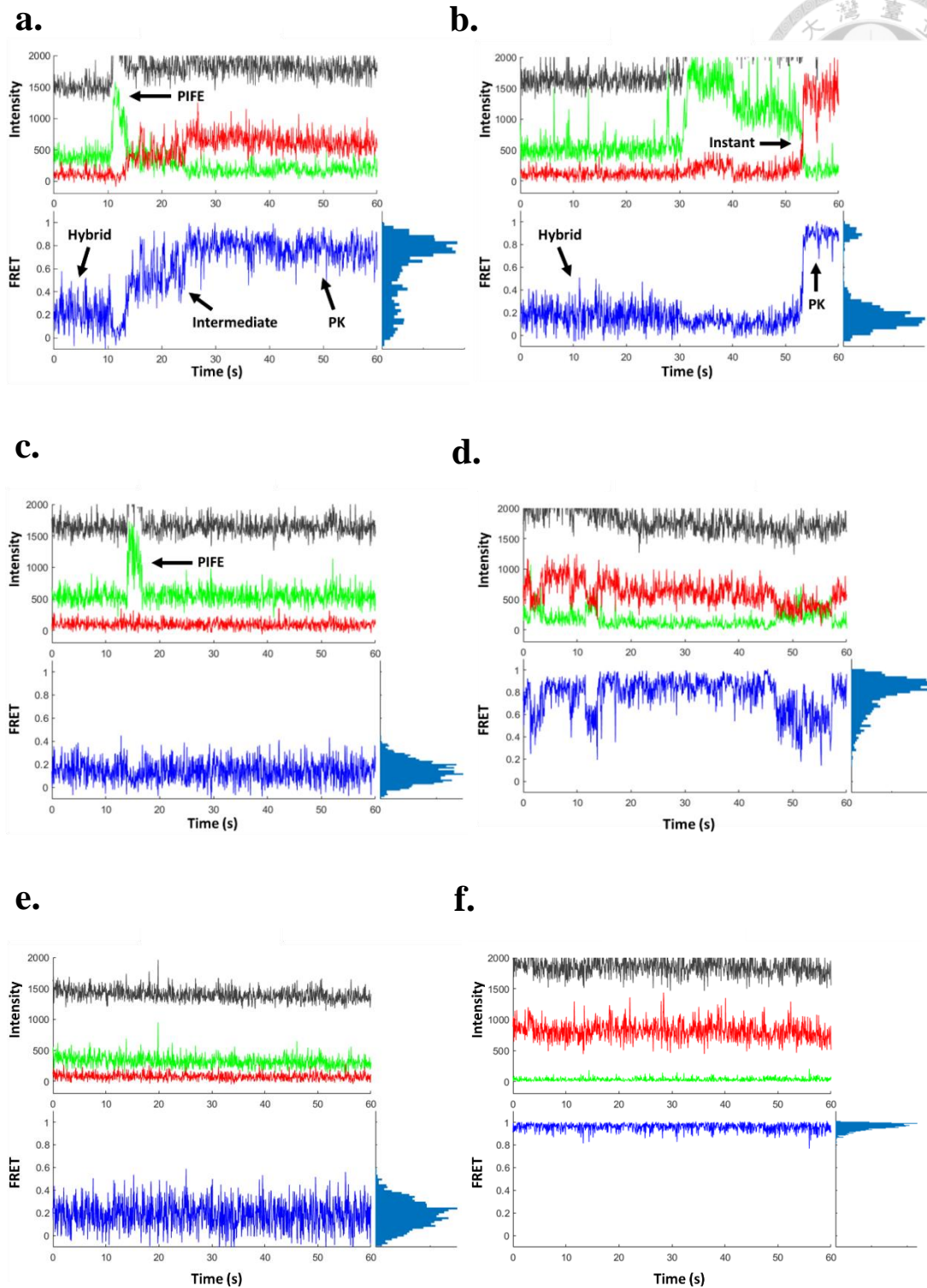


圖 21、經 phi29 DNA polymerase + 0.2 mM dNTPs treatment SARS-CoV-2 RNA FRET 隨時間變化圖

在 0.16 U/ μ L phi29 DNA polymerase + 0.2 mM ATP 處理下 SARS-CoV-2 RNA FRET 隨時間變化具有以下幾種狀態：a. 當 phi29 沿 SARS-CoV-2 RNA 3'-5' 滑動會

先引起上游的 Cy3 發生 PIFE，接下來隨著 RNA 逐漸分離，會形成短時間存在的 intermediate 後再轉變為穩定的偽結，稱作 dynamic (polymerization)；b. 由於 phi29 快速的 polymerization，RNA 會直接 refolding 回偽結而沒有 intermediate 的產生；c. 當 phi29 不足以完全取代 SARS-CoV-2 RNA 或 phi29 單純靠近 Cy3 時，會在發生 Cy3 PIFE，FRET 會維持在 low FRET；d. phi29 作用至一半便結束形成 SARS-CoV-2 RNA 構型上不穩定的變化，稱作 dynamic (unstable)；e. phi29 未成功作用使結構仍維持在 RNA-DNA hybrid 而 FRET 則在穩定 low FRET；f. phi29 於拍攝前快速作用，SARS-CoV-2 RNA 已轉變回穩定的偽結結構。

(Date from 2022/7/1)

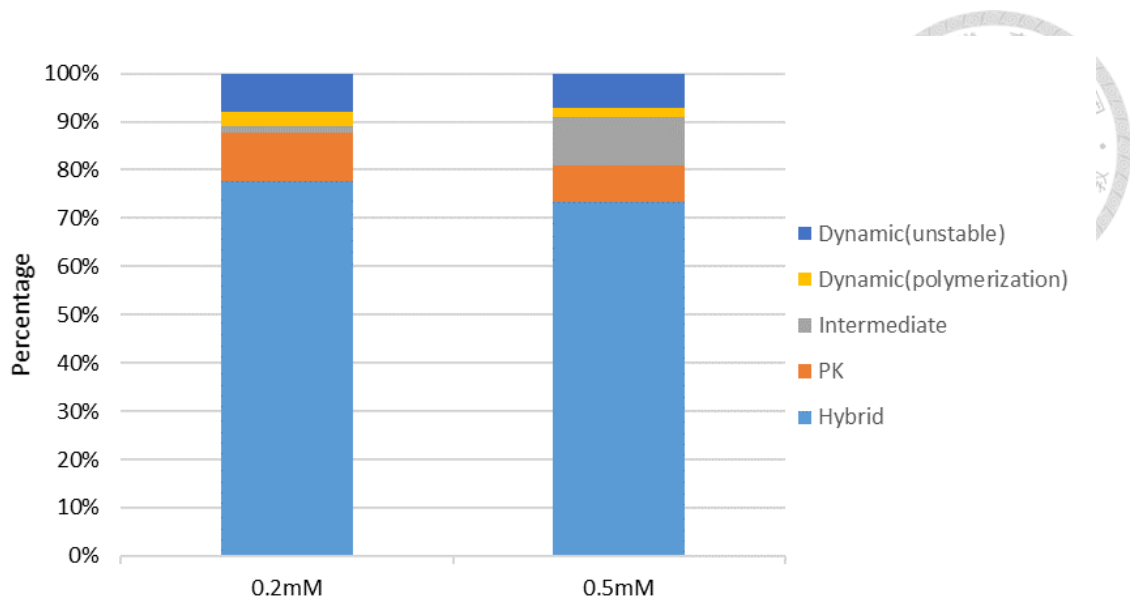


圖 22、在 phi29 DNA polymerase 與 0.2 mM、0.5 mM dNTPs 濃度作用當下 SARS-CoV-2 RNA 不同構型的比例

SARS-CoV-2/DNA hybrid 經 0.16 U/μL phi29 DNA polymerase 及 0.2 mM、0.5 mM dNTPs 作用下 SARS-CoV-2 RNA 構型主要可以分類為 5 種構型：RNA-DNA hybrid (淺藍色)、偽結(PK, 橘色)、intermediate(灰色)、動態變化-聚合(黃色)、動態變化-不穩定(深藍色)。其中在相對高 dNTPs 濃度下有更多的 RNA-DNA hybrid 會轉變並維持在為 intermediate，然而偽結的比例反而並沒有上升；具動態變化的 RNA 分為聚合過程中改變構型的及因結構不穩定而在不同構型間變化的，在不同 dNTPs 濃度下兩者比例皆無明顯差異。

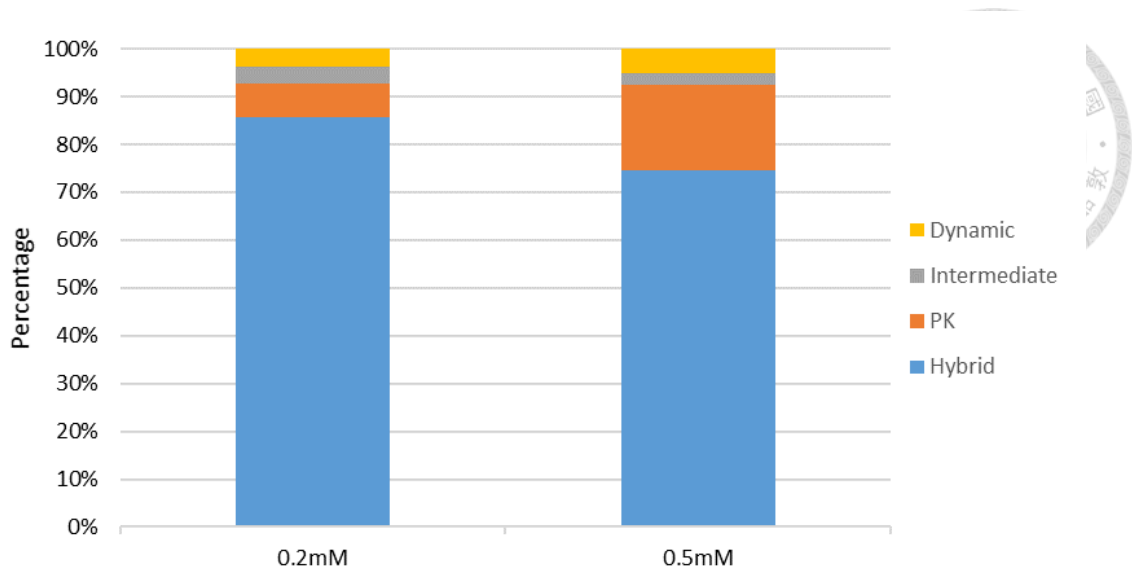


圖 23、在 phi29 DNA polymerase 與 0.2 mM、0.5 mM dNTPs 濃度作用後 SARS-CoV-2 RNA 不同構型的比例

SARS-CoV-2/DNA hybrid 經 0.16 U/ μ L phi29 DNA polymerase 及 0.2 mM、0.5 mM dNTPs 作用後沖掉，使環境內不存在 enzyme 及 dNTPs 下 SARS-CoV-2 RNA 構型主要可以分類為 4 種構型：RNA-DNA hybrid（藍色）、偽結(PK, 橘色)、intermediate(灰色)、動態變化（黃色）。其中在相對高 dNTPs 濃度作用後有更多的 RNA 被重新摺疊回偽結，而在把 phi29 和 dNTPs 移除後具動態變化或 intermediate 的不穩定 RNA 比例相差不大。

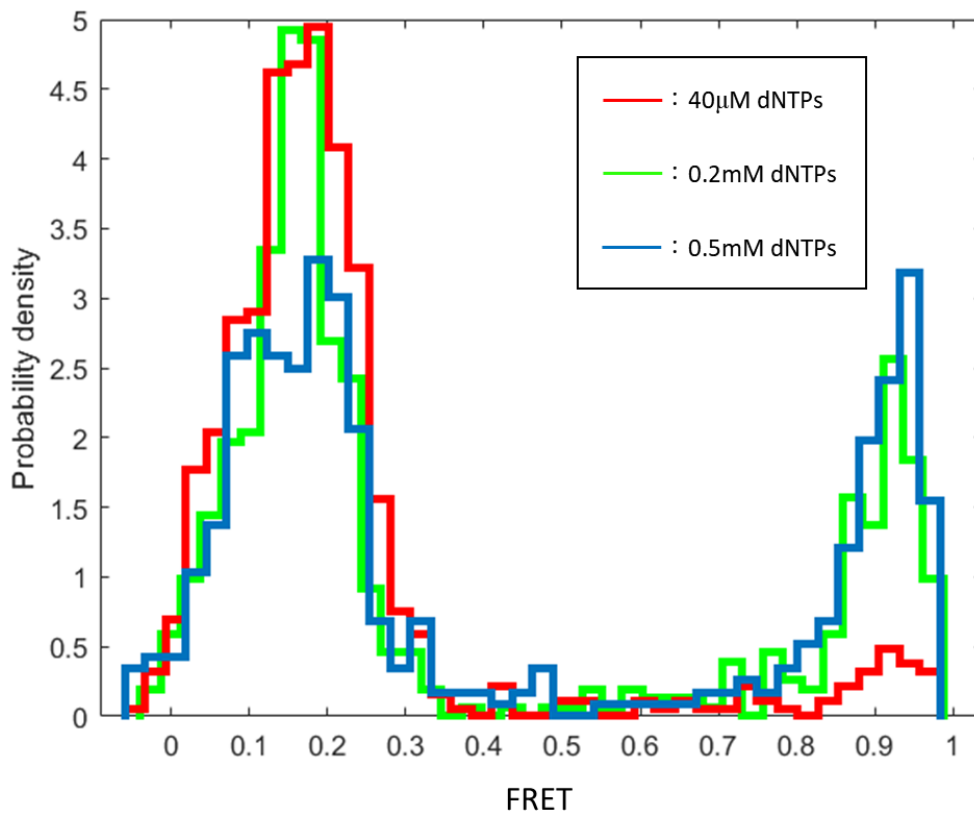
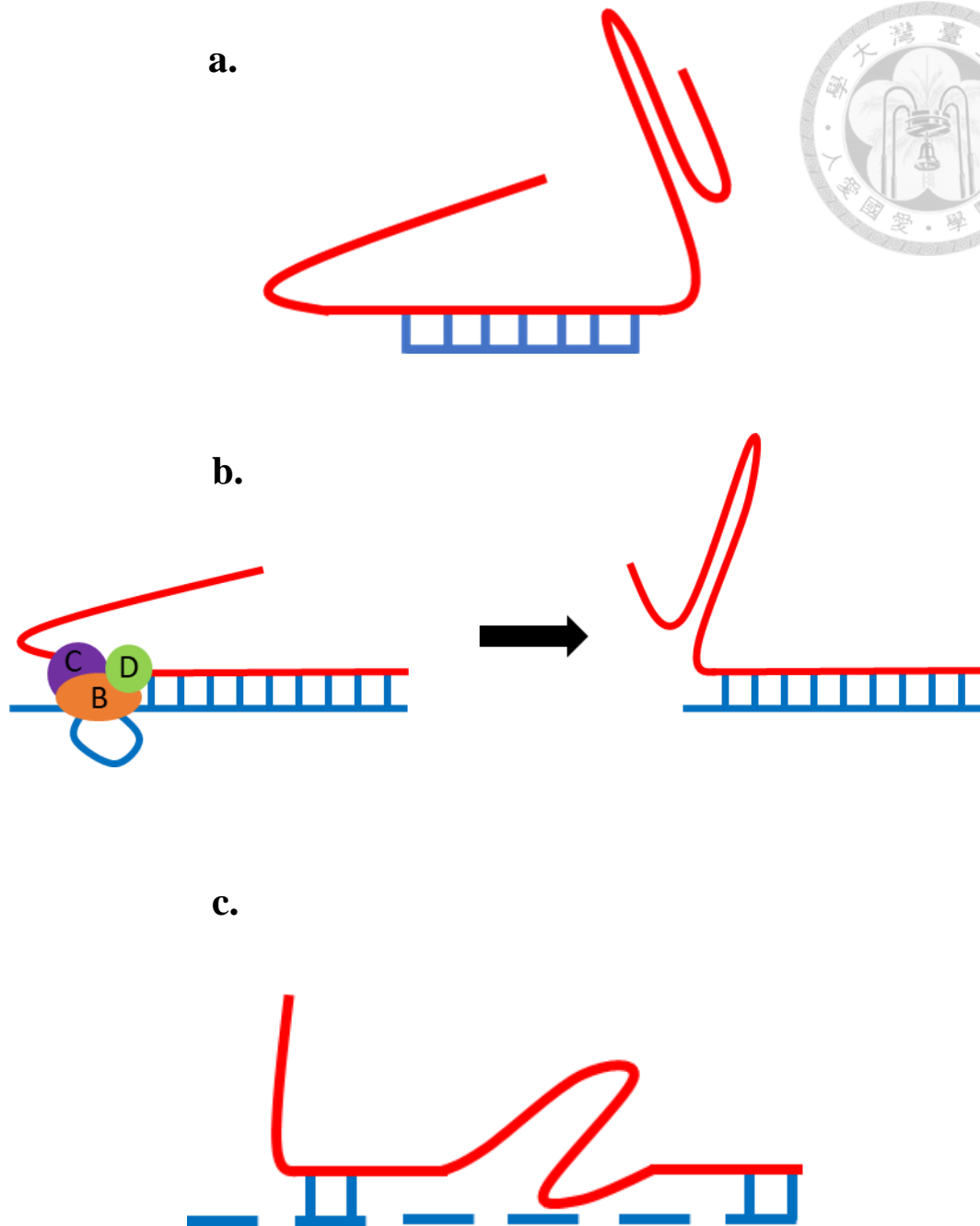


圖 24、SARS-CoV-2 RNA 經 phi29 DNA polymerase 與不同 dNTPs 濃度作用並穩定後 FRET 分布圖

SARS-CoV-2 RNA 在 0.16 U/μL phi29 DNA polymerase 及不同 dNTPs 濃度作用 15 分鐘後將 phi29 與 dNTPs 沖掉並於 42°C 加熱 5 分鐘的 FRET 分布，縱軸為機率密度，橫軸為 FRET 值。40 μM dNTPs 作用後少部分分子從 RNA-DNA hybrid (FRET = 0.164, 95%) 轉回偽結 (FRET = 0.927, 5%)；在 0.2 mM dNTPs 下偽結 (FRET = 0.924) 比例增加至 28%，而 RNA-DNA hybrid (FRET = 0.158) 仍有 72%；於 0.5 mM dNTPs 下則有更多偽結的比例 (FRET = 0.934, 37%)，相對的 RNA-DNA hybrid (FRET = 0.152) 剩下 63%。

(Date from 2022/7/1)



 : Exonuclease V (RecBCD) — : DNA strand — : RNA strand

圖 25、Exonuclease V 作用後動態變化結構的推測

造成 Exonuclease V 作用後 State 2 與 State 3 間快速的動態變化可能的 model 推測：

a. SARS-CoV-2 3' & 5' overhang unstable model ; b. SARS-CoV-2 loop-tail unstable model ; c. SARS-CoV-2 endonucleolytical unstable model.

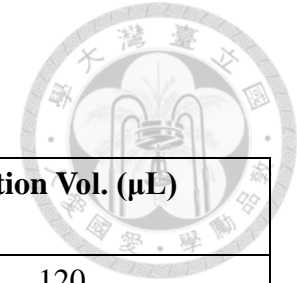


表 1、CoV2u-Cy3 與 CoV2d-Cy5 label 效率

	M.W. (g/mol)	RNA E260 (L/mol·cm)	OD260	Conc.(ng/μL)	Conc.(μM)	Elution Vol. (μL)	
CoV2u-Cy3	9808.53	257300	36.20	1380	140.7	120	
CoV2d-Cy5	9558.19	275000	52.98	1841	192.6	107	
	RNA Total Amount (ng)	RNA Total Amount (pmol)	Dye Extinction coefficient (L/mol·cm)	OD550	OD646	Dye-probe yield (pmole)	Label efficiency
CoV2u-Cy3	165598	16883	Cy3 (162000)	27.47	-	20348	121%
CoV2d-Cy5	197033	20614	Cy5 (271000)	-	74.57	29443	143%

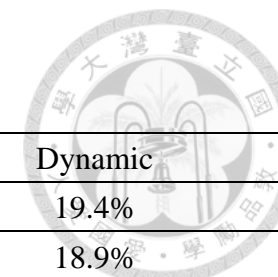


表 2、SARS-CoV-2 RNA 在 Exonuclease V 與不同濃度 ATP 作用下各分子於各型態的比例

ATP concentration \ State	Hybrid	Pseudoknot	Intermediate	Dynamic
1 mM	49.2%	23.1%	8.3%	19.4%
0.1 mM	44.4%	22.7%	14.0%	18.9%
10 μ M	61.2%	13.5%	7.7%	17.7%

表 3a、SARS-CoV-2 RNA 在 Exonuclease V 與不同濃度 ATP 作用下各 state 的 FRET 值

State \ ATP concentration	1 mM	0.1 mM	10 μ M
State 1	0.22 \pm 0.20	0.29 \pm 0.26	0.26 \pm 0.19
State 2	0.50 \pm 0.27	0.46 \pm 0.23	0.46 \pm 0.21
State 3	0.78 \pm 0.20	0.74 \pm 0.20	0.71 \pm 0.20

表 3b、SARS-CoV-2 RNA 在 Exonuclease V 與不同濃度 ATP 作用下各 state 間的轉換速率 (1/s)

	State transfer \ ATP concentration	1 mM	0.1 mM	10 μ M
Forward	1 -> 2	2.39 \pm 0.29	1.36 \pm 0.30	1.37 \pm 0.48
	2 -> 3	2.58 \pm 1.01	1.56 \pm 0.45	1.82 \pm 0.46
	1 -> 3	1.27 \pm 0.48	1.14 \pm 0.96	0.41 \pm 0.24
Reverse	2 -> 1	1.11 \pm 0.41	0.85 \pm 0.19	0.82 \pm 0.06
	3 -> 2	3.99 \pm 1.37	2.17 \pm 0.94	2.50 \pm 0.28
	3 -> 1	1.71 \pm 1.60	0.50 \pm 0.14	0.71 \pm 0.69

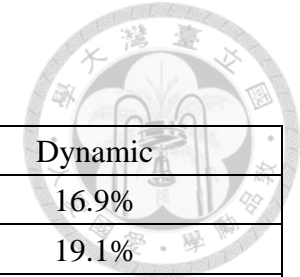


表 4、SARS-CoV-2 RNA 在 Exonuclease V 與不同濃度 ATP 作用 15 分鐘並洗掉後各分子於各型態的比例

ATP concentration \ State	Hybrid	Pseudoknot	Intermediate	Dynamic
1 mM	41.6%	31.2%	10.3%	16.9%
0.1 mM	34.7%	30.9%	15.3%	19.1%
10 μ M	58.5%	18.9%	11.5%	11.5%

表 5a、SARS-CoV-2 RNA 在 Exonuclease V 與不同濃度 ATP 作用 15 分鐘並洗掉後各 state 的 FRET 值

State \ ATP concentration	1 mM	0.1 mM	10 μ M
State 1	0.26 \pm 0.19	0.29 \pm 0.19	0.34 \pm 0.21
State 2	0.50 \pm 0.24	0.54 \pm 0.24	0.57 \pm 0.20
State 3	0.80 \pm 0.21	0.77 \pm 0.20	0.80 \pm 0.16

表 5b、SARS-CoV-2 RNA 在 Exonuclease V 與不同濃度 ATP 作用 15 分鐘並洗掉後各 state 間的轉換速率 (1/s)

	State transfer \ ATP concentration	1 mM	0.1 mM	10 μ M
Forward	1 -> 2	2.16 \pm 0.62	1.97 \pm 0.46	1.05 \pm 0.36
	2 -> 3	2.31 \pm 0.77	1.99 \pm 0.56	1.72 \pm 0.26
	1 -> 3	1.58 \pm 0.13	0.85 \pm 0.16	2.35 \pm 2.18
Reverse	2 -> 1	0.74 \pm 0.18	0.79 \pm 0.23	0.96 \pm 0.23
	3 -> 2	3.71 \pm 2.55	2.66 \pm 0.77	2.40 \pm 0.50
	3 -> 1	0.98 \pm 0.17	0.74 \pm 0.57	1.46 \pm 0.98

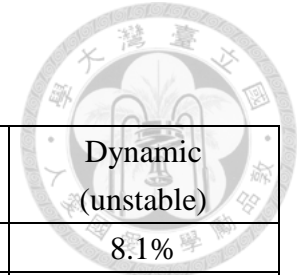


表 6、SARS-CoV-2 RNA 在 phi29 DNA polymerase 與不同濃度 dNTPs 作用下各分子於各型態的比例

dNTPs concentration\ State	Hybrid	Pseudoknot	Intermediate	Dynamic (polymerization)	Dynamic (unstable)
0.2 mM	77.6%	10.0%	1.5%	2.8%	8.1%
0.5 mM	73.4%	7.6%	9.9%	2.1%	7.0%

表 7、SARS-CoV-2 RNA 在 phi29 DNA polymerase 與不同濃度 dNTPs 作用 15 分鐘並洗掉後各分子於各型態的比例

dNTPs concentration\ State	Hybrid	Pseudoknot	Intermediate	Dynamic
0.2 mM	85.6%	7.0%	3.7%	3.7%
0.5 mM	74.6%	17.7%	2.5%	5.1%