

# 新冠病毒 S<sub>2</sub>蛋白结构与功能的生物信息学分析及原核表达

刘玲<sup>1</sup>, 李璟<sup>5</sup>, 范蕾<sup>5</sup>, 宣焱<sup>1</sup>, 杜淼<sup>1</sup>, 张德玖<sup>3</sup>, 李卓禧<sup>5</sup>, 陈晓聪<sup>5</sup>, 杨娅男<sup>1</sup>, 徐本锦<sup>1</sup>

**摘要:**目的 S<sub>2</sub> 是新冠病毒的主要毒力因子,介导了病毒在宿主细胞中的免疫逃逸,扩大了病毒感染范围。本研究对 S<sub>2</sub> 进行系统生信分析及原核表达,有助于全面理解该蛋白在新冠病毒侵染宿主细胞中的分子机理。方法 采用 ORF、PM、MM、QESAF、%O+&Y 和 &?BJOL 6 等工具对 S<sub>2</sub> 的翻译后修饰、理化性质、跨膜螺旋、相互作用网络、同源性及进化特点等进行系统分析;利用分子克隆技术构建重组表达载体: %PMS@Nsp/ 并进行原核表达。结果 S<sub>2</sub> 由 16 个氨基酸组成,分子量 041' UH,等电点为 237,不稳定指数 51 43,在哺乳动物中的半衰期约 368,在大肠杆菌内超过 68,有 15 个可能的磷酸化位点和 3 个 (N糖基化位点,无信号肽和跨膜螺旋,亲水性较强;二级结构分析显示,S<sub>2</sub> 中无规则卷曲占比最高(1266e),其次是 # 螺旋(5227e)和延伸链(5627e),β 转角占比最低(140e);序列对比和进化分析显示,与 &+ \* &! EQ5 S<sub>2</sub> 序列一致性最高的是蝙蝠非典型冠状病毒 a#Q (126e);原核表达发现 S<sub>2</sub> 主要在沉淀中表达,经质谱鉴定目的蛋白就是 S<sub>2</sub>。结论 本研究为新冠病毒 S<sub>2</sub> 的表达、纯化及功能分析提供了重要借鉴,有助于进一步揭示 S<sub>2</sub> 的生物学功能及开展相关抑制剂和抗病毒药物的研发。

**关键词:**新冠病毒; S<sub>2</sub> 蛋白; 生信分析; 结构与功能; 进化分析

中图分类号: R373.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-2694(2022)07-0566-11

J4232 | =810-3600289/ 8 T87 /, B/3823 =3? 1: 2K=; 28D

/C1: 1023 2B&+ \* &! 2GH 3238 T87 =61: 2843

, #), 1B', , #' 1B'<sup>5</sup>, - +\$, F<sup>5</sup>, ] ) +\$ [ HB', U) MHE', . " +\$^ UACT<sup>3</sup>,

, #. 8TEN<sup>5</sup>, ! " %\$ ]IHEAB<sup>5</sup>, [ +\$^ [ HB'B', ] ) RFBCE'

(1. Department of Medical Laboratory, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 63566, China;

5. Department of Basic Medicine, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 63566, China;

3. Institute for Translational Medicine, Qingdao University, Qingdao 57165, China)

+58-12 P8F S<sub>2</sub> /: =E1B, 9F GHBK=UFBA SAE=ES9F K=I> ES&+ \* &! EQ5, GFZH> K+J1 GGTF FAH FIB E9 AEJ> HEZ F: HEZ> 9F K+J1 BFAEB+BF <&Y> GHA @E BE-GHA> HB'J> HEZ: =E HVEAF: F> EBES S<sub>2</sub> /: =E1B; FF : FSE-GF 9E HZ 9F TBZ=> 9EB ES 9F GEFAUH GFAB>G ES &+ \* &! EQ51 BFAEBIB E9AEJ> <ORF, PM" MM, QESAF, %O+&Y, &?BJOL 6 HEZ ESF=9E>; FFTZ F 9E >Y> GHAUJYHJMF 9F: E99B JHEBJ GEZSAEB>; 8Y/N IAEAF GAJ: =E F9F>, 9HB-GFG@HF 8J\, 1BF+AEBB9, E=, SEGEJEY HEZ RKEJ9EB+Y A8#AF+9A ES S<sub>2</sub> /: =E1B< P8F =AEG@B-B9F: F> EB KFAE: %PMS@N S<sub>2</sub> /; H AEB9TA9Z 9BET?8 GEFAUH AEBB? 9ABEJEY HEZ F: F> FZ1BH

山西省基础研究计划(自由探索类)项目(\$E 565/6365/53304)、国家级大学生创新创业训练计划项目(\$E 565/4/L66)、山西省高等学校大学生创新创业训练计划重点项目(\$E 8565/4/L661)、山西省高等学校科技创新项目(\$E 5656 640)、山西医科大学汾阳学院引进人才科研启动金项目(\$E 5656+6)、吕梁市科技计划项目(\$E 5656"- . 50)和国家自然科学基金项目(\$E 3/1461/7)联合资助。刘玲、李璟、范蕾对本文有同等贡献。

通讯作者:徐本锦,%GHU: @6457! >GT FZT AB;

(\*! #U: 666666651.1666.6

作者单位: / <山西医科大学汾阳学院医学检验系, 汾阳 63566;

5 <山西医科大学汾阳学院基础医学部, 汾阳 63566;

3 <青岛大学转化医学研究院, 青岛 57165

: =E HVE9A >Y> G< S<sub>2</sub> / I> AEG EFZ ES /16 H3EE HAZ>, ; 198H GEFAUH; F?89ES /041' UH: EFJA9A: EB9ES 2<37 HEZ HBIB99J1 91BZF ES 51 43 #98+ H8JUSF ES 368 1B GGGJ HB-F9AUEAF> HEZ GEF 98B /6 81B E. coli #9 8+ /5: E99BJ: E> EYH9EB>9>, 98FF: E99BJ ( N2YAE N >YH9EB>9> HEZ EE >?BJ

KI=> a#Q/ 8Z 9F 8?F-9-F\_TFBAFIZB9Y !1266e " ; I99F \$> / : -E9IBES&+ \* &N! EQI5<+9F= : E HVE9AF: F->EB# \$> / : -E9IB; H>SETBZ 9 @ GHIBYF: F->FZIB9F: FA: I99F I9F=AFB9ST79EBES@AF+HJY+9F <P8 947F9: -E9IB; H> ST-9F=IZF9BZF H \$> / @Y GH> > F99EGF9Y<P8> >9ZY: -EKZF> HBI G E-9IB9-9F-FBAF SE= 9F F: F->EB#: T4\$A9EB HEZ STB99EBJ HBJY4>ES&+ \* &N! EQI5 \$> / : -E9IB#HEZ ST-9F=FKFJ> 9F @EE7AJ STB99EB>ES \$> / #98T>: -EKZIB> HFSN F-FBAF SE= F+H+8HEZ ZFKJE GFB9ES-FH9ZIB8@9=>HEZ HB9K-HJ Z-T?><

Z/; L2?0F&+ \* &N! EQI5%\$> / : -E9IB#@EISE-G9A-HBJY4>%9TA9F HEZ STB99EB%9KEJT9EB-HY HBJY4>

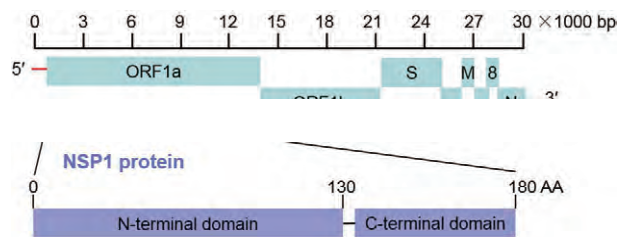
&T: : E-9Z @Y -TBZ-HFB9J \*F+H+8OE7+HG ES&8BN OEBKBAF ! \$E 565/6365/53304" #9F \$9EBJ ! EUP7F &9ZFB9: #BEN K9EBHEZ %9F: FBT=>8: P4HBB? OE7+HG ! \$E 565//4/L66" #XYOEFA9 ES#BEBK9EBHEZ %9F: FBT=>8: P4HBB? OE7+HGSE ! EUP7F &9ZFB9>IB &8BN OEBKBAF ! \$E &565//4/L661" #&AFB9SAHEZ PFABBEJE7HJ #BEBK9EB OE7+HG ES "I?8F= %ZTA9EB#B999EB>IB &8BN ! \$E 5656 640" #8949B -TBZ SE= P4FB9#9EZTA9EBES -FBH9B! EUP7F ES&8BN MFZAJ ) BK=>9Y ! \$E 5656+6" #OEFA9ES, KIH9! I9Y &AFBAF HEZ PFABBEJE7Y OE7+HG ! \$E 5656&" - . 50" #HEZ \$9EBJ \$9T+HJ &AFBAF -ETBZ9EBES! 8BH! \$E 3/1461/7" <IT, IB? #, I'IB? HEZ -HB, H AEB9@9ZF\_TJY 9E 98>H99AF< ! E-F> EBZ? HT9E=\$] T RFB9B#%GHU \$@645! >GT FZTAB

560年/5月#由新冠病毒!&+ \* &N EQI5"引起的肺炎疫情在中国武汉暴发#患者表现为发热&咳嗽&肺部磨玻璃样病变等呼吸系统病变#或伴随腹泻等消化系统症状<sup>[5]</sup>)截止565/年0月51日#新冠肺炎累计确诊病例已超过53/亿例#累计死亡病例超过L42万例<sup>[3]</sup>)新冠疫情的迅速蔓延给全球医疗体系带来了严峻考验)因此#揭示&+ \* &N EQI5的传播机制及其关键蛋白的结构与功能成为遏制疫情的关键)

&+ \* &N EQI5属\$冠状病毒#是一种包膜单股正链 \* \$+ 病毒<sup>[12]</sup>)其基因组约36' @#由一个2帽子和2非翻译区!2) P\* "#6个开放读码框!E FB-HZB? SHGF>#( \*->"以及一个多聚腺苷酸化的3非翻译区!3) P\* "组成<sup>[7]</sup>) (\*- /H和 (\*- /@是&+ \* &N EQI5的5个主要 (\*- #约占病毒基因组的46!图/" ) (\*- /H@通过核糖体移码被翻译成多聚蛋白:: /H或:: /H@<sup>[4]</sup> #最后被加工成 /7种非结构蛋白!BEB9TA9T+J : -E9IB# \$&O" # \$&O"具有多种酶活性#参与病毒 \* \$+ 复制和转录调控)

\$> / 由 (\*- /H的2末端编码!图/" #是感染细胞中产生的第 / 种冠状病毒蛋白<sup>[9]</sup> #其主要功能是通过结合核糖体抑制宿主基因表达<sup>[6]</sup>)目前#国内外有关&+ \* &N EQI5 \$> / 蛋白结构与功能方面的研究报道仍然较少)本研究利用生信分析手段对&+ \* &N EQI5 \$> / 的性质&翻译后修饰&结构域等进行了系统分析#还对其进行了同源性分析&进化分析及原核表达)本研究有助于揭示 \$> / 在&+ \* &N

! EQI5 侵染宿主细胞中的作用机制#同时有助于加快针对 \$> / 的靶向药物研发)



图M &+ \* &N 2GH基因组结构示意图  
-4-M 89I -8D2&+ \* &N 2GH<31 / 2 <30823

1 材料与amp;方法

1.1 材料 限制性核酸内切酶 Nde#&Xho# 购自 \$%R# %PN55@空质粒为本实验室保存#U\$+ 分子量标准购自宝生物!大连"#蛋白分子量标准&质粒提取&凝胶回收试剂盒以及感受态细胞购自全式金公司#其它生化试剂购自国药)

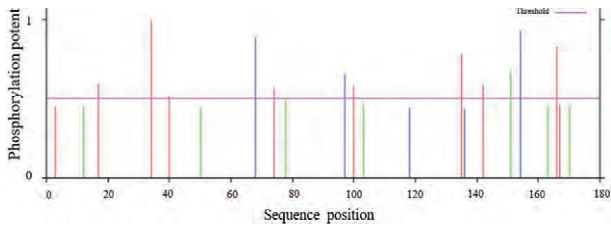
1.2 载体构建及原核表达 用 Xho# 和 Nde# 对 : %PN55@空质粒和 Nsp/ 基因同时双酶切#回收酶切产物后将 Nsp/ 基因与载体连接#转化 PE /6感受态细胞并进行菌落 Q \* 验证) \$> / 蛋白的诱导表达步骤参照文献执行<sup>[5]</sup>)

1.3 生信分析 对 \$> / 蛋白的理化特性&跨膜螺旋&亲\* 疏水性等进行全面分析#相关分析网站如表 / 所示) \$> / 蛋白的多序列比对与系统进化分析参照文献执行<sup>[5]</sup>)

表M 生物信息分析网址

0-5M J42321-810-3600L/5280

分析项目	分析网站
	+BJYt>I9G> +BJYt>; F@t9>
理化性质	899>://; F@R\; H4YE?/: =E9H#G/
跨膜螺旋	899>://>F-KAF>8HJ87A8Z9 Z />F-KAF<8 ?PM" MM56
亲/疏水性	899>://; F@R\; H4YE?/: =E9AJF/
磷酸化位点	899>://>F-KAF>8HJ87A8Z9 Z />F-KAF<8 ?\$90EE>13<
糖基化位点	899>://>F-KAF>8HJ87A8Z9 Z />F-KAF<8 ?\$F9\$^YAV 6 899>://>F-KAF>8HJ87A8Z9 Z />F-KAF<8 ?[1B( [H8V 5
亚细胞定位	899>://: >E-989A6 /SE-G589G
信号肽	899 ://; ; ; A@Z9 Z />F-KAF/>&?BJQL 6/
二级结构分析	899>://B >Ht +@k@A S/A1N@B/ B >LH9EG9J ?; HFc B >L>E G<89G
结构域分析	899>://; ;



图S 新冠病毒 S蛋白的磷酸化位点

-4S A92092:68230602B&+\* &N! 2GH S0M1: 284B

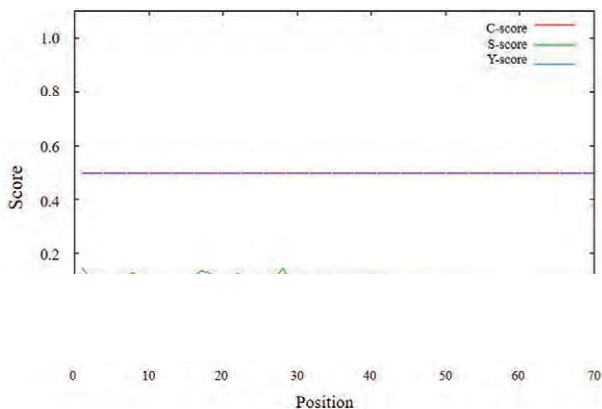
表[ S蛋白的磷酸化位点及对应的激酶

0-5V A92092:68230602B S0M1: 284B=3?  
D2: A12345 K4300

位点	分值	激酶	位点	分值	激酶	位点	分值	激酶
84	6205	OX+	84	6274	OX^	845	6211	!X##
83	6006	TB:	[04	672	TB:	P/2	670	!X##
86	6277	!X##	866	6244	TB:	[/2	607	TB:
[71	6412	TB:	832	6442	TB:	877	6451	TB:

注:TB: 表示未确定的激酶。

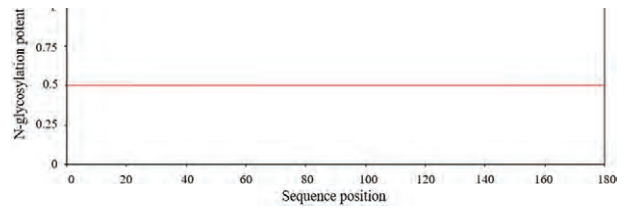
2.5 S蛋白亚细胞定位与信号肽预测 预测得知272e的S蛋白在细胞质,36ke存在于细胞核,线粒体、分泌小泡和细胞骨架中各占L3e。对S蛋白前46个残基进行分析后发现,S蛋白不含信号肽(图2)。



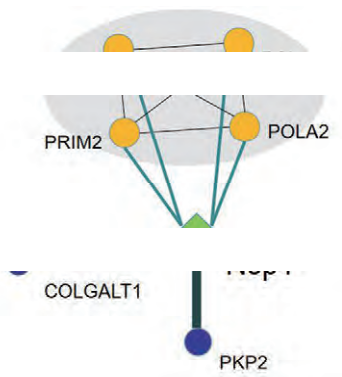
图T 新冠病毒 S蛋白信号肽预测

-4V A748232B&+\* &N! 2GH S0M1: 28404361/1N  
8P/

2.6 S蛋白糖基化位点预测 没有信号肽的蛋白质不太可能暴露于N糖基化机制,因此可能不会被糖基化(在体内)。利用SFSA^NA/6&F=K=预测后发现,S蛋白可能不会被N糖基化修饰(图7)。



图P 新冠病毒 S蛋白 N



图U 新冠病毒 Nsp1蛋白相互作用网络

NCBI: 360028281-360028281

新冠病毒 Nsp1 蛋白的 N 末端为  $\alpha$  螺旋，C 末端结构域 (residues 116-130) (图 16)。Nsp1 是  $\beta$  冠状病毒和  $\gamma$  冠状病毒的一个特征性蛋白，在抑制宿主基因表达和抗病毒反应方面表现出功能保守性和机制多样性。尽管新冠病毒 Nsp1 蛋白之间的序列同源性较低，但其核心结构共享一个相对保守的球状结构域。

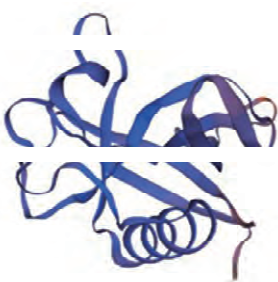
$\beta$  冠状病毒 Nsp1 的 C 末端结构域通过与核糖体 L6 亚基的 GTP 通道结合，干扰 GTP 结合进而抑制宿主蛋白质翻译。这种抑制机制可能是  $\beta$  冠状病毒特有的，因为 Nsp1 的 C 末端在  $\beta$  冠状病毒中较短，并且在包括 MERS 冠状病毒在内的其他  $\beta$  冠状病毒中并不高度保守。

$\beta$ -CoV Nsp1 C-terminal domain

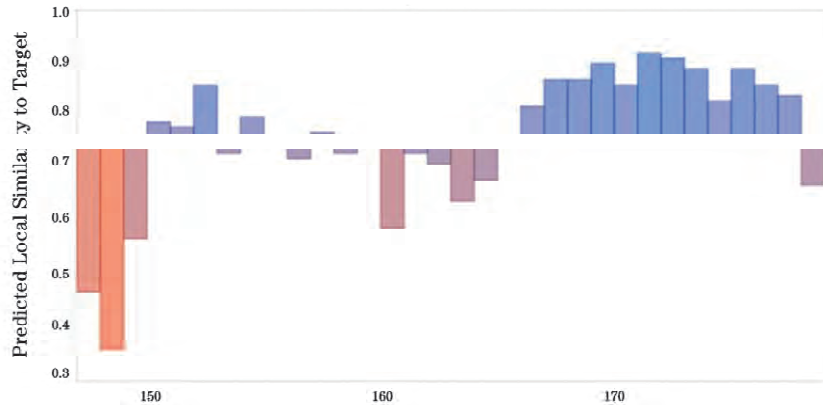
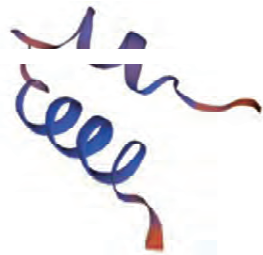
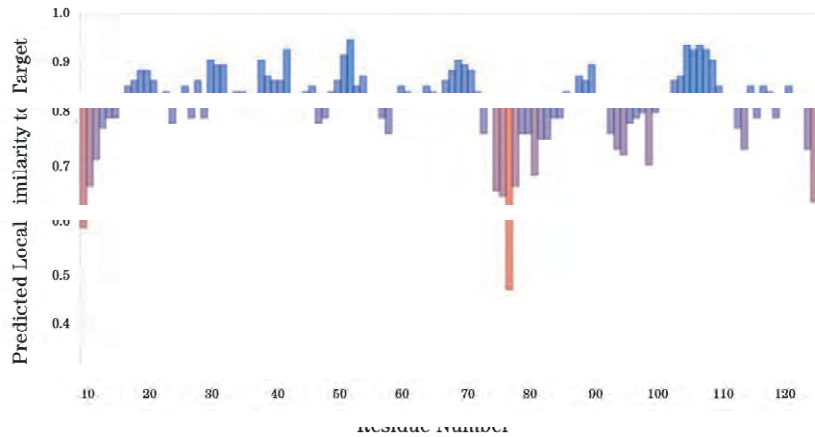
图MN 新冠病毒 Nsp1蛋白的结构域分析

NCBI: 360028281-360028281

2.10 Nsp1 蛋白的三维结构 根据蛋白质三级结构建立网站构建 Nsp1 蛋白的三级结构。结果只显示 116-130 位点、116-130 位点的三级结构模型 (图 17)。



Local quality estimate

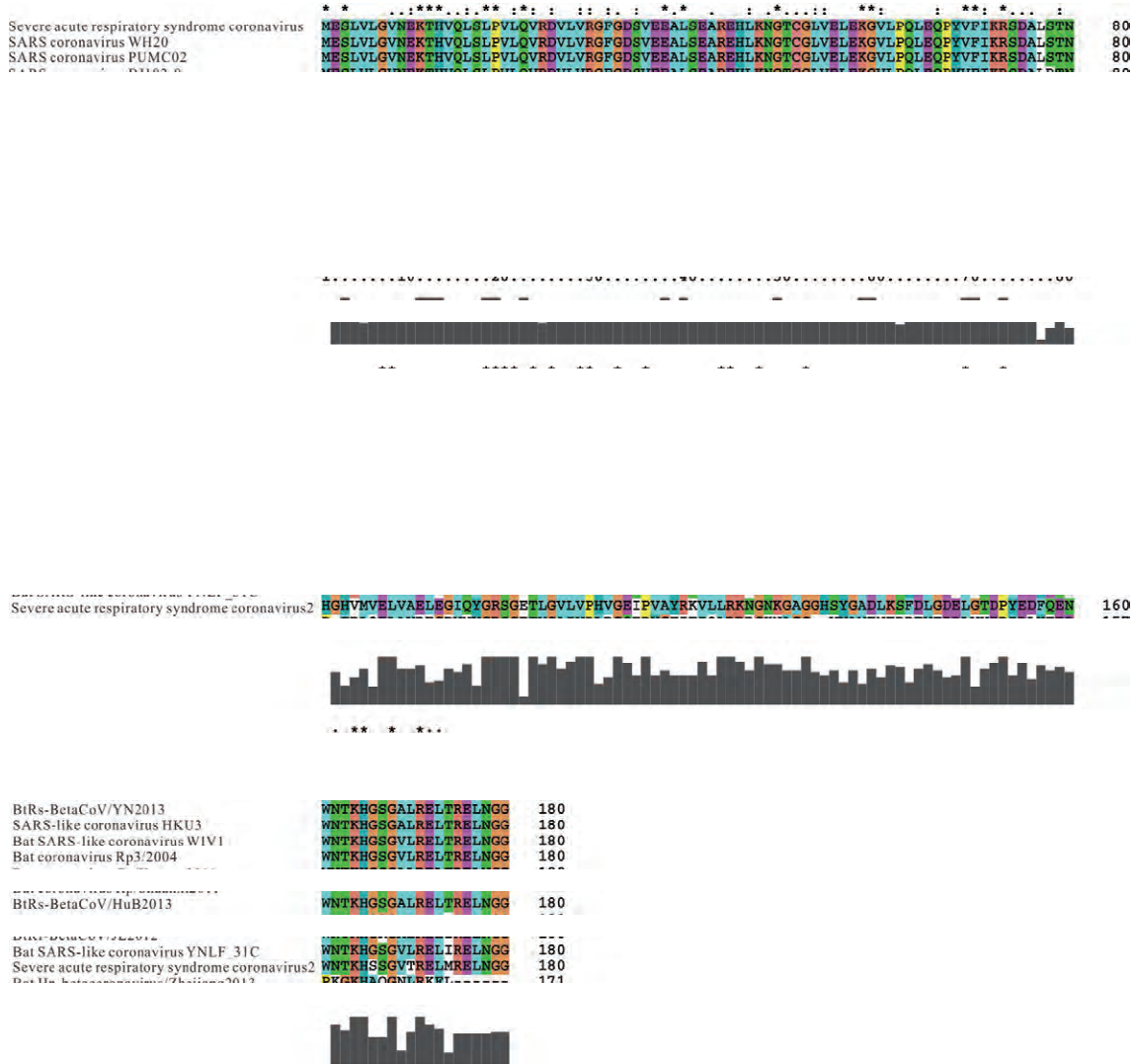


图MM 新冠病毒 Nsp1蛋白的三维结构分析

NCBI: 360028281-360028281

2.11 S<sub>1</sub> / 蛋白序列同源性分析 通过 NCBI 网站检索发现,与新冠病毒 S<sub>1</sub> / 序列最接近的是 R<sub>19</sub> &+ \* &W' F AE-EB-K=T> a#Q/ (126e),接着是 R<sub>19</sub> AE-EB-K=T> \*; /88HBN 56//、严重急性呼吸综合征冠状病毒、&+ \* &AE-EB-K=T> a" 56 和 &+ \* &

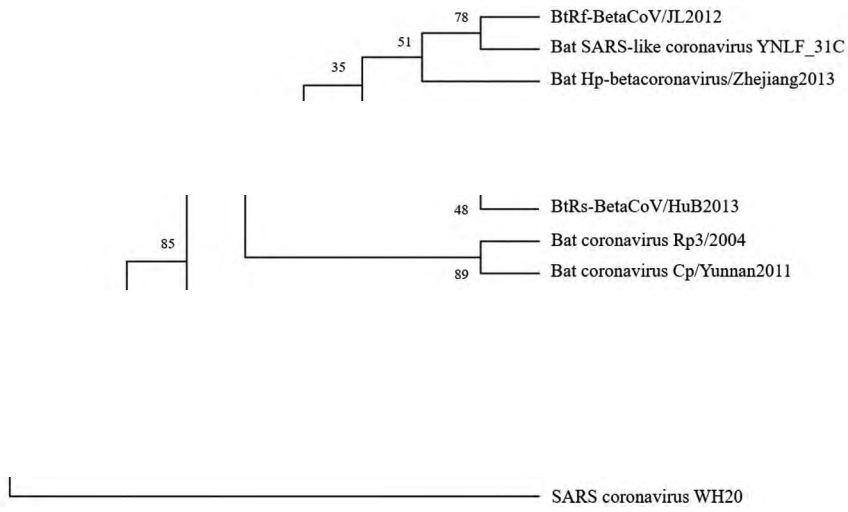
AE-EB-K=T>O) M! 65,序列一致性均为 1L ke, 与 R<sub>19</sub>": N@P AE-EB-K=T>/. 80-B?56/3 的序列相似度为 51 4e。所有序列中相同的残基占比 5/ 4e (\* 所示),性质相似的占比 70ke (: 所示),相似性较低的占比 74e (所示)(图/5)。



图MH 新冠病毒 S<sub>1</sub>蛋白序列同源性

2.12 S<sub>1</sub> / 的进化树构建 结果显示,这 2 种病毒的蛋白与 &+ \* &N EQ5 的 S<sub>1</sub> / 蛋白亲缘关系较远,R<sub>19</sub>>NRPH EQ/[ 56/3 与非典型冠状病毒 " X) 3 聚为一支,置信度为 45,聚为一支后与蝙蝠非典型冠状病毒 a#Q/ 聚为一支,置信度为 30。此外,R<sub>19</sub>SIRPH EQ/, 56/5 与 R<sub>19</sub>&+ \* &W' F AE-EN B-K=T> [ \$, - 3/! 聚类为同一支,置信度 41;R<sub>19</sub> AE-EB-K=T> \*; /88HBN 56// 与 R<sub>19</sub>>NRPH EQ/ " TR56/3 聚类为同一支,置信度 L1(图/3)。

2.13 表达载体: %P155@Nsp/ 的构建  
 2.13.1 Nsp/ 的酶切与 Q \* 验证 用 Nde # 与 Xho # 对 Nsp/ 进行酶切(图/L+);Q \* 扩增 Nsp/ 序列,电泳检测显示片段大小合适(图/LR)。  
 2.13.2 : %P155@Nsp/ 的酶切及转化 用 Nde # 与 Xho # 同时酶切重组载体,电泳检测显示片段大小正确(图/2+);将: %P155@Nsp/ 转化 PE /6,于 34 g 恒温培养 /38(图/2R 左),提取质粒后测序验证,选取正确的转化 R 5/ (图/2R 右)。

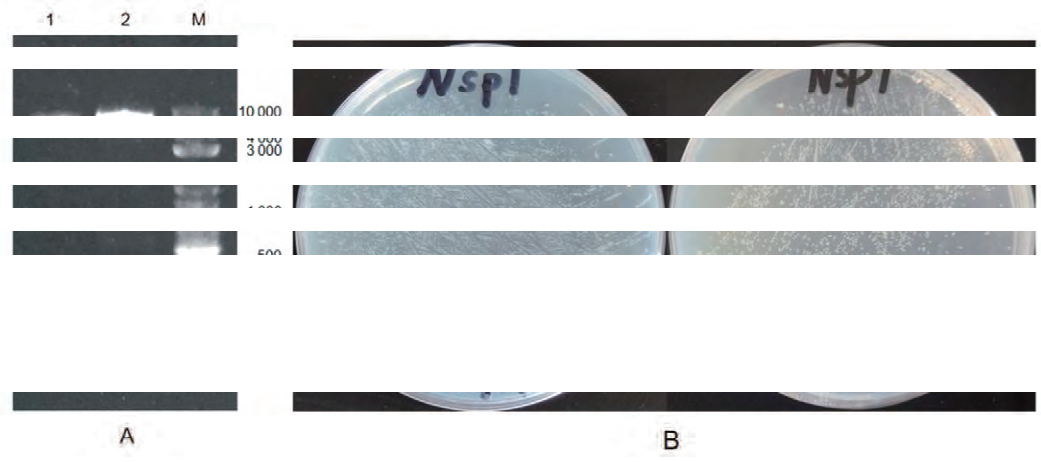


图M 新冠病毒 Nsp1蛋白系统进化树  
 -4M A96/3808// B+ \* & N 2GH Nsp1: 343



+: Nsp1 双酶切实验 /: Nsp1 酶切产物 M: 500bp U\$+ G# F= R: 菌落 O \* /" 7 阳性单克隆  
 图M5 Nsp1的酶切与菌落 A \*

-4M5 \* / 84823/32376-0 ?4/823-3 D623 A1 \* E-64-823 B ?\$M



+: %PMS@Nsp1 酶切实验 /: 不酶切 5: 双酶切 R: %PMS@Nsp1 转化实验 (左: PE /6, 右: R 5')  
 图M7 1%OH-B1?Nsp1的酶切和转化

-4M7 %3, 1 / ?4/823-3 8-3821-823 B1%OH-B6H (

2.14  $\beta$ -gal 蛋白表达 菌体培养至  $OD_{600}$  为 0.6  
" 0.7 时用 0.2 GGEJ/L IPTG 去诱导, 15e 8U&N  
O+ ^% 检测显示,  $\beta$ -gal 蛋白表达量经诱导之后显著  
上调(泳道 L 和泳道 6); 对诱导前和诱导后的全细  
胞裂解液、上清液、沉淀分别检测后发现,  $\beta$ -gal 主要  
表达在沉淀(泳道 3, 7; 泳道 O, 5)(图 7)。对泳道  
7 和 5



列保守程度、 $\text{A}$  含量、密码子组成等对于原核表达都具有重要影响。通常情况下,蛋白分子量超过  $166' \text{U}$  或低于  $2' \text{U}$  时均难以表达。分子量太小的易被降解,通过加入融合标签  $\text{P}$ 、 $\text{P}$ 、 $\text{MRO}$  或者较大的促融合蛋白标签有助于使目的蛋白正确折叠,并以可溶形式表达;对于密码子进行优化,也可提高目的蛋白的翻译效率和表达量。本文生物信息学分析显示, $\text{S}_{\text{g}}$  / 蛋白分子量  $1041' \text{U}$ 、等电点  $2.37$ ,性质较稳定,在哺乳动物中半衰期约  $368$ 。在 *E.coli* 内大于  $168$ 。无信号肽和跨膜螺旋,亲水性较强,不属于分泌蛋白。无规则卷曲在  $\text{S}_{\text{g}}$  / 蛋白中占比最高 ( $1266\text{e}$ ),其次是  $\beta$  螺旋 ( $5227\text{e}$ ) 和延伸链 ( $5627\text{e}$ ),以上结果为进一步揭示该蛋白的结构及功能提供了数据基础。

糖基化和磷酸化修饰是生物体内最重要的翻译后修饰方式,糖基化对蛋白的折叠、免疫原性、稳定性及定位具有重要影响。磷酸化修饰可改变蛋白的生物活性,从而调控细胞内信号转导。蛋白的磷酸化修饰与病毒粒子增殖、组装和复制密切相关,在调控病毒与宿主的代谢中起重要作用。本研究分析显示, $\text{S}_{\text{g}}$  / 有 3 个 ( $\text{N}$ 糖基化位点及  $15$  个磷酸化位点,然而仍需进一步实验验证。系统鉴定病毒蛋白的磷酸化位点并揭示其调控机制将有助于抗病毒药物的研发和病毒感染机制的阐明。

$\text{E}+\text{N}$  EQ 的  $\text{S}_{\text{g}}$  / 蛋白通过“双管齐下”的策略抑制宿主基因表达,它首先结合核糖体  $\text{L6\&}$  亚基,在翻译起始的不同阶段使经典的  $\text{G}^*\text{S}+$  翻译 ( $\text{A}+\text{N}$   $\text{E}+\text{B}+\text{A}+\text{J}$   $\text{G}^*\text{S}+$   $\text{H}+\text{B}+\text{J}+\text{H}+\text{E}+\text{B}$ ) 停滞<sup>[110]</sup>。其次, $\text{S}_{\text{g}}$  / 与核糖体结合导致宿主  $\text{G}^*\text{S}+$  的酶切和降解。然而, $\text{S}_{\text{g}}$  / 与病毒  $\text{G}^*\text{S}+$  的  $\text{E}$  )  $\text{P}^*$  保守区相互作用进而避免自身蛋白翻译停滞的机制还有待进一步研究<sup>[56]</sup>。本文多序列比对显示, $\text{E}+\text{N}$  EQ 的  $\text{S}_{\text{g}}$  / 序列一致性为  $1\text{L}4\text{e}$  (图/5),提示二者具有相似的理化性质和生物学功能。研究发现  $\text{E}+\text{N}$  EQ  $\text{S}_{\text{g}}$  / 的  $\text{I}$  末端残基  $\text{X}/\text{L}$  和  $"/72$  在  $\text{S}$  冠状病毒中高度保守,二者对  $\text{S}_{\text{g}}$  / 与  $\text{L6\&}$  亚基的相互作用至关重要, $\text{X}/\text{L}+$  和  $"/72+$  的突变导致  $\text{S}_{\text{g}}$  / 无法结合  $\text{L6\&}$  并抑制翻译起始<sup>[10]</sup>。近期, $\text{E}+\text{N}$  EQ  $\text{S}_{\text{g}}$  / 的  $\text{I}$  末端区域折叠成两个螺旋,插入  $\text{G}^*\text{S}+$  入口通道,阻碍  $\text{G}^*\text{N}$   $\text{S}+$  进入进而抑制宿主蛋白翻译。第  $1$  个螺旋 ( $023\text{N}/76$ ) 与  $\text{L6\&}$  核糖体蛋白  $\text{T83}$  和  $\text{T82}$  形成疏水作用,第 5 个螺旋 ( $877\text{N}/41$ ) 与  $\text{F836}$  和  $1\text{I}\&=^*\text{S}+$  的  $\text{S}/1$  相互作用。保守的  $\text{X}''$  二肽 ( $\text{X}/\text{L}$  和

$"/72$ ) 与  $\text{S}/1$  形成关键相互作用,这种相互作用是基于  $"/72$  与  $764$  和  $736$  之间的碱基堆积力,以及  $\text{X}/\text{L}$  与  $752$  和  $736$  的磷酸骨架之间的静电相互作用。此外, $\text{E}+\text{N}$  EQ  $\text{S}_{\text{g}}$  / 的  $\text{X}/\text{L}$  和  $"/72$  残基对于核糖体结合和抑制宿主基因表达至关重要<sup>[11,55]</sup>。以上结论与本文多序列比对结果相吻合。

结构域分析显示, $\text{S}_{\text{g}}$  / 的  $\text{S}$  端 ( $\text{P}5\text{N}/33$ ) 为冠状病毒  $\text{S}_{\text{g}}$  / 球状结构域, $\text{I}$  端 ( $6\text{L}1\text{N}/40$ ) 为  $\text{S}$  冠状病毒  $\text{S}_{\text{g}}$  /  $\text{I}$  末端结构域 (图/6)。  $\text{S}+\text{E}+\text{X}$  等<sup>[53]</sup> 对  $\text{E}+\text{N}$  EQ  $\text{S}_{\text{g}}$  /  $\text{S}$  末端 ( $\text{X}/\text{N}/52$ ) 的结构与功能研究发现,单独的  $\text{S}$  末端不能与核糖体共定位并抑制宿主蛋白翻译,单独的  $\text{I}$  端可与核糖体共定位但其抑制蛋白质翻译能力明显减弱。有趣的是,将  $\text{S}_{\text{g}}$  / 的  $\text{I}$  端与增强型绿色荧光蛋白 ( $6\text{N}$   $-\text{O}$ ) 或其他蛋白融合以取代其  $\text{S}$  端,可将蛋白翻译抑制能力恢复到与全长  $\text{S}_{\text{g}}$  / 相当水平。这就说明  $\text{S}_{\text{g}}$  / 的  $\text{S}$  末端能够稳定  $\text{I}$  末端同核糖体的结合,并作为非特异性屏障阻断  $\text{G}^*\text{S}+$  通道从而抑制宿主细胞翻译,因此  $\text{E}+\text{N}$  EQ  $\text{S}_{\text{g}}$  / 主要通过其  $\text{I}$  端抑制宿主翻译,但  $\text{S}$  末端是  $\text{S}_{\text{g}}$  / 发挥功能所必需的。 $\text{X}/\text{L}$ 、 $8\text{L}5$  和  $-\text{L}3$  残基靠近  $\text{E}+\text{N}$  EQ  $\text{S}_{\text{g}}$  / 的  $\text{I}$  末端,参与  $\text{L6\&}$  核糖体亚基的结合<sup>[11,54,9]</sup>。本研究发现, $\text{X}/\text{L}/-\text{L}3$  序列保守性不高,除  $\text{E}+\text{N}$  EQ  $\text{S}_{\text{g}}$  / 之外,其它序列中有  $1\text{L}$  条对应残基均为  $\text{X}/\text{L}/-\text{L}3$ 。此外, $\text{R}+\text{B}+\text{Z}+\text{F}+\text{Q}$  等<sup>[52]</sup> 鉴定到一个  $\text{X}/\text{L}/-\text{L}3$  缺失的  $\text{E}+\text{N}$  EQ  $\text{S}_{\text{g}}$  / 基因组,这种缺失变异可能改变  $\text{S}_{\text{g}}$  / 蛋白的结构,抑制  $\text{S}_{\text{g}}$  / 同  $\text{L6\&}$  核糖体结合,影响病毒和宿主基因表达调控的活性<sup>[57]</sup>。以上结果表明, $\text{E}+\text{N}$  EQ  $\text{S}_{\text{g}}$  / 的  $\text{Nsp}/$  基因正在经历一个进化过程,这可能有助于病毒更好地适应人类宿主。

最后,本文构建了  $\text{E}+\text{N}$  EQ  $\text{S}_{\text{g}}$  / 蛋白的表达载体:  $6\text{P}+\text{E}+\text{N}$   $\text{Nsp}/$  并完成原核表达,初步建立了  $\text{S}_{\text{g}}$  / 蛋白表达条件。当培养至 ( $\text{U}_{\text{OD}}$  为  $6\text{k}''$   $67$  时加入  $62\text{GGEJ}/,$  ) 诱导,先  $34\text{g}$ 、 $556$   $=/\text{GB}$  培养  $528$ ,接着  $52\text{g}$   $\sqrt{76}=/\text{GB}$  继续培养  $08$ 。结果显示, $\text{S}_{\text{g}}$  / 蛋白出现过表达且主要在细菌裂解液离心之后的沉淀中表达 (图/7),经质谱鉴定 (图/4),沉淀中主要表达的确实是目标蛋白  $\text{S}_{\text{g}}$  /。因此大规模纯化  $\text{S}_{\text{g}}$  / 用于疫苗研发或结构分析应考虑优先从  $\text{R}\%$  糶婆 9H 黠培斜隆主%

经包涵体纯化的蛋白活性好。需要指出的是,本文还预测到 \$S\_{\alpha}\$ / 存在糖基化和磷酸化修饰,鉴于原核表达系统没有翻译后修饰功能,因此功能研究实验应考虑从真核系统去表达该蛋白。

综上,本文对 &+ \* &N EQ15 的 \$S\_{\alpha}\$ / 进行了较为全面的生信分析、表达载体构建及原核表达,研究结果将有助于深入了解 \$S\_{\alpha}\$ / 的生物学功能和设计靶向药。基于本研究结果,将来可针对以下方向进行重点攻关:1) \$S\_{\alpha}\$ / 蛋白有效抑制宿主细胞翻译但不影响自身蛋白表达的分子机制的阐明;2) 针对 \$S\_{\alpha}\$ / 蛋白的靶向药物设计;3) 针对 \$S\_{\alpha}\$ / 蛋白所涉及的关键信号通路开发特异性的抑制剂;4) 针对 \$S\_{\alpha}\$ / 蛋白或基因的高灵敏度病毒检测方法的开发;5) 系统鉴定 \$S\_{\alpha}\$ / 蛋白的翻译后修饰位点并阐明其调控机理。

#### 4 结 论

\$S\_{\alpha}\$ / 性质稳定,亲水性较强,有多个翻译后修饰位点,原核表达后发现其主要在细菌裂解液离心后的沉淀中表达。因此,其功能研究可能采用真核系统的可溶性表达更适宜。此外,该蛋白序列保守性高,且主要定位于宿主细胞的细胞质与细胞核中,提示其功能重要。本研究为针对该蛋白的纯化、结晶、结构分析、抗体制备和体外功能研究提供了重要的较好的数据基础,有助于加快针对 \$S\_{\alpha}\$ / 的靶向药物研发。

!感谢中国科学院生物物理研究所质谱平台为本文 \$S\_{\alpha}\$ / 蛋白鉴定所提供的大力支持"#

利益冲突:无

引用本文格式:刘玲,李璟,范蕾,等<新冠病毒 \$S\_{\alpha}\$ / 蛋白结构与功能的生物信息学分析及原核表达 [J]. 中国人兽共患病学报, 5655, 31 (4): 277-287 < U(#: /63070C>>B/665N570L 5655 66 64

#### 参考文献:

[1] 吴雅玲, 陈骥, 王德民 &+ \* &N EQ15 和新型冠状病毒肺炎: 发病机制与药物开发研究进展 [J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 5656, 37 (2): 165V/7 < U(#: /6456L7C>>B/666N 2544 5656 62 64

[5] OFB [ , UT \$ , , H [ , F9H < &TATF > ES 9F &+ \* &N EQ15 BIAFAEH }Z HBZ 9BT =: F=> FAPK > SE = Z-T? Z-F?B [ ] < &MR( ' , 5656, 30(56) :F/62031 < U(#: /642525/FG@5656/62031

[3] aE-JZ " HJ9B (=7BD9EB-aFP JYE F+9EBJ T: Z9F EB! (N QAUVOB1 &F 9FG@= 565/O.%R/( , ) < 565/16051 ) [565/146N 61] < & > ://; ; ; < &EB9: T@A9EB/>G/19G/; FP JME F=N H9EBJNT: Z9FEBABKZVQ51N:F 9FG@= 565/

[L]. SET O: [H9], , aHB [ ] ^, F9H <+ : BFTGEBHET9&H H=N

>EAI9Z ; 198HBF; AE-EBK=T>ES: EQ@F @9E+1B [ ] < \$H 97F, 5656, 210(401) :546543 < U(#: /64631 /L/217N656 N 56/5N4

[2] ! E-EBK+ZHF >9ZY ?-ET: ES 9F 1BF-B9EBJ AEGG9FF EB 9NEBEGY ES O<PBF > FAF > RKF-FHAT9 F> I+9EY > YBZ-ECFN =FU9Z AE-EBK=T>: AH+HSMB? 56/QB EQ HBZ B-HB? 19 &+ \* &N EQ15 [ ] < \$9 MAE@EJ, 5656, 2(L) :23722L < U(#: /64631 /L/27LN656N6702ND

[7] &GFEB M, ! HKIB9E P, \*EZ4?TFD U, F9H <#(B; /) FAPB? &+ \* &N EQ15H @E-EGFI BF+H9EB [ ] < EGGTBREJ, 565 / L ( /) :4/2 < U(#: /64631 /L/5663N65/ N65572N6

[4] +>H \* , XTGH# &Q9BZY R, F9H < &TATF+H1B? &9> 1BE &+ \* &N EQ15: =9TB [ ] < MEJ REJ, 565 / L33(5) :/7452 < U(#: /6467/CG@5656/1 65L

[1] " FJGY [ + , -H DY M, %H+ , HZ + , F9H <PBF ABKZVQ: HBN ZFGA: + AEG =F8BHKF =RKF; ES 9NEBEGY, 7FB9A, F. IZFN GEEZY, ZH9EE>

=>I+QY>YEZ-EGF AE-EBK-IT>: -E9IB B> / I> HEBKFJ FTN  
 'HAYEPA94BJHPEBIBB@QE=999-F. F>F> GTUP.JF >9. > ES  
 94BJHPEBIB94PEB [ ] < Q-EJ, 56/5, 17(5L):/3201V3761 <  
 U(#: /64/51/ Q#6/Q21N/5  
 [10] XH-Q9B a, " THB ! , \$H#YH-B X, F9H <+ 9 EN =EBZF  
 >94P7YQE>T: : F>>8E9: -E9IB>YBZF>@Y &+\* &AE-EBK-IT  
 T> \$> /: -E9IB [ ] < \$49&9TA9MEJ REJ, 566, /7(//)://3LN  
 //L6<U(#: /64631/B>G@K716  
 [56] " THB ! , E T7HG4F X^, \*EBKA>' M, F9H <+\* &AE-EBK-  
 K-IT> B> /: -E9IB IZTA> FG J4P4ZF: FBZFB9FBZEBIAFEJY9A  
 AFHK4F ES G\* \$>+: K4J G\* \$>+ HF F499B9QE B> /NBN  
 ZTAFZ \* \$+ AFHK4F [ ] < Q E& O9E?, 56//, 4 (1/5):  
 F/66L33<U(#: /6434/CT-EBJ <: H9466L33  
 [5] &8T@9X, X4HET4>U, 'EGHH+, F9H <+\* &N! EQ15 \$> /  
 @BZ>9F 4@E-EGJ G\* \$+ A8-EEJ QE IBB@994BJHPEB [ ] <  
 \$49&9TA9MEJ REJ, 5656, 54(1/6):020177<U(#: /64631/  
 >L/20LN656N62//N1  
 [55] &8FB . . 8HB ^, [HB [ , F9H <, Y4BF /L1> A49AJ SE=  
 &+\* &N! EQ15 \$> / IBB@9EBES8E97FBFV: F>4EB [ ] < ^FB

Q-EJ, 565/ , /65(/): QK66/2/3-U(#: /64600QK666/2/3  
 [53] .8E X, XF . , " T " , F9H <9TA9H @4> HEZ STBAPBES  
 9F \$ 9-GBI> ES &+\* &N! EQ15 EEB9TA9HJ: -E9IB / [ ] <  
 MAE@EJ & FA9, 565/ , O(/):F66705/ <U(#: /64/51/& FAN  
 94TG6670N5/  
 [5L] RHF-@F +X, RHBE M\*, R-TAF %+, F9H <+\* &N! EQ15 Z>N  
 =T: 9> JAB9, 94BJHPEB, HEZ: -E9IB 94\$AIB9 QE>T: : F>>  
 8E9Z5FBF> [ ] < IJ, 5656, /13(2):/352V330<U(#: /6<  
 /67/CAEJ 5656466L  
 [52] RFBZ99 - , 8BZT= ^+, ^B4-BF99 M, F9H <%GF=4B9 ESH  
 &+\* &N! EQ15 K4J 94HIB; 198HZF9PEBIBB: / [ ] < P4BJ  
 MFZ, 5656, /1(/):350<U(#: /64/17/>5074N656N65264  
 N2  
 [57] \$4H4H HX, MH1EE &4VFA9B>G>ESAE-EBK-IT> \$> /NCFN  
 Z4PZ AEB9EJ ES 8E9HEZ K4J 7FB FV: F>4EB [ ] < IJ>,  
 565/ , /6(5):366<U(#: /63306/AEJ/6656366

收稿日期:2021N10N11 编辑:梁小洁

(上接第 272 页)

[14] XT:SF=>ABGZ9X, CE7U ^ <" E: @Z1> ( GAEB >EGF AJTF>  
 HF FCF=4B9 [ ] <8AFBAF, 565/ ,34(7243): /36LV362<U(#:  
 /64/57/>AFBAF HAO415  
 [1] 孙丹, 杨金燕, 夏婷婷, 等 <新型冠状病毒 (GAEB 变异株的  
 流行病学特征及防控研究进展 [ ] <中华医院感染学杂志,  
 5655,35(1):/577V546<U(#:/64/17/AB8 5655N5/347  
 [10] (DEE &. 8HB [ , (ZF " , F9H <+\* &N! EQ15 U7L^ >I' F  
 GT9PEBIB44H4F> FB9Y FSAFBAV; 198FB8BAFZ +! %5@EZN  
 IB9 H5B9Y [ ] < \$49! EGGTB, 565/ ,/5(/):1L1 <U(#: /6<  
 /631/>L74N65/ N5//1N5  
 [56] Q9F=>FB %, \$9ETG - , " T U&, F9H <%GF=7FBF ES BF;  
 &+\* &N! EQ15 K4H4B9ESAEBAF-B ( GAEB (R4 < 250) N8?8N  
 J?89 +S4A4-F4H4A8A4H4U9F>, @T9FV: EF> G4E=' EE; JN  
 FZ7F 7H>, IBF\_TI9F> ES K4ABF Z>94@9EB, IBZF\_THAF> IB  
 2JE@H! ( Q4UVO-F> EBF HEZ AEB9EJ FSE9 [ ] <4B9 #BFA9  
 U>, 565/ ,/L:571N545<U(#:/6467/CQZ 565/ #/ 6L6

[5] aHB? \*, ! 8FB' , " EDTG [ , F9H <%GF=4B9 K4ABF@4H N  
 94ET?8&+\* &N! EQ15 K4H4B9 [ ] <+4=]IK, 565/ ,75(5):L/5N  
 L55<U(#:/6465/HA>G4A6L2/  
 [55] 'FBIB ^M, " EIGF> %4 <P8F V9FB9ESAEZEB T44F @H4IB  
 84GB \* \$+ K4T4F>HEZ19REJTBEB4Y E47B [ ] <Q=4T> \*F>,  
 5663-05(/):/N4U(#:/6467/>671N/465(65)66360N  
 [53] ,I [ , [HB [ , aHB \$, F9H <! T44F ES&+\* &N! EQ15 7FB>  
 G?894H94E9F FB4-EBGB9ES84GB4JTB9 FV: F>4FZ 7FB>  
 [ ] <MEJ ^FB9 ^FEEGA-, 5656,502(7):/234V2L7<U(#:/6<  
 /664/>66L31N656N64/ON6  
 [5L] QXBG4 O, X4H4EJ + , 891BF= &, F9H <I E-EBK-IT> @EJE?Y  
 HEZ FJ44PEB: I G J44PEB>SE=&+\* &N