

DOI:10.13350/j.cjpb.240101

• 论著 •

猴痘病毒相关蛋白 A42R 的生物信息学及分子对接分析

王道¹, 刘文彬², 宋甜^{1*}

(1. 中南大学湘雅二医院妇产科, 湖南长沙 410011; 2. 湖南师范大学生命科学学院)

【摘要】 目的 通过生物信息学及分子对接分析以了解猴痘病毒(monkeypox virus, MPXV)相关蛋白 A42R 的结构特征、抗原表位以及小分子抑制物。**方法** 利用生物信息学和分子对接技术对 MPXV A42R 蛋白的开放阅读框、蛋白同源性、理化性质、翻译后修饰位点、二级/三级结构、B/T 细胞抗原表位、配体结合位点以及小分子化合物等进行预测分析。**结果** A42R 蛋白由 133 个氨基酸组成, 分子质量为 15.003 42 ku, 理论等电点 9.36。该蛋白与天花病毒、骆驼痘病毒、痘苗病毒、牛痘病毒的序列一致性高, 而且与天花病毒有最近共同祖先。A42R 蛋白以不规则卷曲为主要结构, 属于亲水性蛋白; 含有 2 个 O-糖基化位点、1 个 N-糖基化位点和 14 个磷酸化位点; 含有 5 个 B 细胞抗原表位, 23 个 CLT 细胞抗原表位, 16 个 Th 细胞抗原表位, 6 个抗原决定簇; 含有 8 个可能的配体结合区, 10 个潜在的小分子化合物。**结论** A42R 为亲水性蛋白, 含有丰富的 B、T 细胞抗原表位和配体结合区, 可为抗猴痘病毒药物和疫苗的设计与开发提供参考。

【关键词】 猴痘病毒; A42R 蛋白; 生物信息学; 分子结构; 抗原表位

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2024)01-0001-09

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Jan;19(1):1-9.]

Bioinformatic and molecular docking analysis of monkeypox virus related protein A42R

WANG Dao¹, LIU Wenbin², SONG Tian¹ (1. Department of Obstetrics and Gynecology, the second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410011, China; 2. College of Life Sciences, Hunan Normal University)

【Abstract】 Objective Based on methods of molecular docking and bioinformatics, we aim to get insight into MPXV related A42R protein structure, antigenic epitope and small molecular compounds. **Methods** Series of bioinformatic methods and molecular docking technology such as NCBI ORF Finder, ClustalW2.1, ProtParam, ProtScale, NetNGlyc1.0, YinOYang1.2, NetPhos3.1Serve, SOPMA, SWISS-MODEL, IEDB, SYFPEITHI, Discovery Studio and Pymol were used to analyze open reading frame, sequence homology and phylogeny, physicochemical properties, post-translational modification sites, secondary/tertiary structures, B/T cells epitopes, ligand binding sites and small molecule compounds.

Results It showed the A42R protein was composed of 133 amino acids, with a molecular weight of 15.003 42 ku and an isoelectric point of 9.36. It showed highest sequence identity with variola virus (98.50%), camelpox virus (99.25%), vaccinia virus (96.99%), cowpox virus (97.74%) and had the closet evolutionary distance with variola virus. It was a hydrophilic protein with 2 O-glycosylation site, 1 N-glycosylation site and 14 phosphorylation sites, and 5 B-cell epitopes, 23 CLT-cell epitopes, 16 Th-cell epitopes, 6 antigenic determinant, 8 possible ligand-binding regions, 10 potential molecule compounds (Nadide, Flavtin, Tannic acid, Pralmorelin hydrochloride, Nelfinavir, Ingenol dibenzoate, Trifolirhizin, Oleanolic beta-D-glucopyranosyl ester, Daphnoretin, Hydnocarpin). **Conclusion** The research provides a basis for exploring the mechanism of monkeypox virus infection, and give a reference for the design of antiviral drugs and vaccines targeting MPXV A42R.

【Key words】 MPXV; A42R protein; bioinformatics; molecular structure; antigen epitopes

* 猴痘病毒(monkeypox virus, MPXV)是一种含有包膜的双链 DNA 病毒, 属于痘病毒科(Poxviridae)正痘病毒属(Orthopoxvirus)^[1]。MPXV 是能引起人类致病的 4 种正痘病毒之一, 其它 3 种分别是天花病毒(variola virus, VARV)^[2]、牛痘病毒(cowpox virus, CPXV)^[3] 和痘苗病毒(vaccinia virus, VACV)^[4]。1958 年, MPXV 首次在猴群中被发现, 这些猴群正从非洲运往丹麦哥本哈根用于脊髓灰质炎疫苗的研究^[5]。1970 年, 刚果民主共和国报道了第一例人畜共患的 MPXV 传播病例是一名 9 个月大的婴儿^[6]。MPXV 感染的数量每年有所增加, 但主要发生在非洲

究^[5]。1970 年, 刚果民主共和国报道了第一例人畜共患的 MPXV 传播病例是一名 9 个月大的婴儿^[6]。MPXV 感染的数量每年有所增加, 但主要发生在非洲

* **【通讯作者】** 宋甜, E-mail: tiansong@csu.edu.cn

【作者简介】 王道(1984-), 男, 湖南长沙人, 博士, 主管技师, 主要从事病毒感染机制等方面的研究。
E-mail: wangdao5153@csu.edu.cn

大陆,并未引起足够重视。感染猴痘(monkeypox, MPX)者通常出现头痛、发热和流感样症状及淋巴结肿大^[7],之后不久表现为典型的皮疹痘病变,皮疹发生的时间和分布与 VARV 相类似。大多数患者在 2~4 周内可以恢复,而且在并发症发生率、病死率和疤痕化程度等方面都不及天花疾病严重,极少数感染者会出现致命。MPXV 在系统发育上存在两个毒力不同的分支:刚果分支和西非分支^[8]。刚果分支起源于非洲刚果盆地,相比西非分支更具致病性,传染性更强,感染者的病死率为 10.6%,而西非分支病死率为 3.6%^[9]。刚果分支能选择性地下调宿主反应,引起宿主细胞凋亡,这可能是该分支相对于西非分支毒力上升的原因^[10]。2022 年 4 月以来,MPXV 持续在世界各地爆发,截止至 2023 年 2 月,超过 109 个国家报告了 8.65 万确诊病例,主要发生在美国、欧洲和巴西^[11]。世界卫生组织于 2022 年 7 月 23 日宣布人类猴痘病毒传播成为全球关注的突发公共卫生事件,而且 MPXV 主要来源仍然有待确认,相关证据表明 MPXV 首先是从非洲流行地区传到北美和欧洲,然后在人与人之间传播^[12]。

MPXV 呈椭圆形或砖形,是一种被脂蛋白外膜包裹的病毒,具有线性双链 DNA 基因组,其中分离的 MPXV-Zaire-96-I-16 基因组大小为 196.8 kb,具有 191 个开放阅读框,来源于刚果分支。2022 年 MPX 疫情毒株来源于西非进化支上一个新的分支,与 2017~2018 年在尼日利亚 MPX 疫情蔓延至英国的毒株最为相似^[13]。MPXV 一般通过口咽、鼻咽或皮内途径进入宿主体内,在感染部位持续复制,然后扩散到淋巴结。经过一段时间的初始病毒血症迅速传播到身体的其它器官,造成一系列病理生理相关的改变^[14]。MPXV 生活在胞浆中,编码多种促进免疫逃逸的蛋白质,这类蛋白能够破坏宿主细胞相关的免疫调节和病毒识别信号途径。如 MPXV 编码与双链 RNA 结合的 F3 蛋白能阻断细胞抗病毒信号传递,B16 蛋白能抑制 I 型 IFN 与其受体结合^[15-16]。此外,从 2022 年爆发的 MPXV 中分离出的病毒似乎存在更多的突变,表明目前的 MPXV 也已经发生了次级进化,使得复制能力、感染毒性等改变,以便适应更多的新宿主^[17]。Ma 等^[18]利用 MpoxVR 平台发现了少量不同于以往的新突变体,这些新突变体是如何影响病毒感染的尚不清楚。因此,鉴于 MPXV 对全球健康的威胁和无症状感染者出现^[19],迫切需要建立有效的临床诊断方法,以及开发安全有效的猴痘疫苗和抗病毒药物。

尽管对 MPXV 基因组学和流行病学有着广泛的了解,但关于 MPXV 重要蛋白的结构和功能的研究还不够深入,MPXV gp152 基因编码的 A42R 蛋白与真

核细胞 profilin 蛋白具有显著的氨基酸序列同一性,但仍不清楚高度保守的 profilin 样蛋白在 MPXV 感染周期中的作用。本研究运用多种生物信息学方法预测分析 MPXV A42R 蛋白的理化性质、分子结构和抗原表位,为 MPXV 特异性药物和疫苗的研发提供一定的理论依据。

材料与方法

1 材料

通过美国国家生物信息中心(national center for biotechnology information,NCBI)的 GenBank 查找已报道的 A42R 蛋白的氨基酸序列,最终获取 9 条与 A42R 蛋白相关的痘病毒全长氨基酸序列:MPXV-Zaire(NP_536579.1)、MPXV-2022(YP_101377149.1)、CMLV(Q77NF.1)、CPXV(NP_619961.1)、VARV(ABF24320.1)、VACV(QQ05880.1)、ECTV(NP_671660.1)、RCNV(YP_009143471.1)和 SKPV(YP_0092828256.1)。

2 方法

2.1 MPXV A42R 蛋白氨基酸序列相似性及系统进化分析 通过 ClustalW2.1 分析 MPXV A42R 蛋白与其余物种的序列相似性;利用遗传进化分析软件 MEGA11 构建系统进化发育树,进行 A42R 蛋白的系统进化分析。

2.2 MPXV A42R 蛋白的生物信息学分析 采用多种生物信息学网站和数据库,对 MPXV A42R 蛋白的核苷酸和氨基酸序列进行分析,运用 NCBI ORF Finder 预测 MPXV gp152 基因的开放阅读框;运用 ProtParam 和 ProtScale 分析 A42R 蛋白的理化性质和亲/疏水性;运用 SignalP5.0 和 TMHMM2.0 分别对 A42R 蛋白的信号肽和跨膜结构进行预测;运用 NCBI Conserved Domains 和 Cell-Ploc2.0 分析 A42R 蛋白的功能结构域以及在宿主细胞的亚细胞定位;运用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 预测该蛋白的二级/三级空间结构,利用 SAVESv2.0 服务器的拉曼光谱图(Ramachandran Plot)对预测模型进行验证;运用 NetNGlyc1.0、YinOYang1.2、NetPhos3.1Serve 分别预测该蛋白翻译后修饰的 O-糖基化、N-糖基化、磷酸化和 SUMO 化位点;运用 Prankweb 网站预测 A42R 蛋白可能的配体结合位点;运用 Discovery Studio 和 Pymol 软件进行小分子化合物与 A42R 蛋白的对接可视化;运用 IEDB 和 SYFPEITHI 网站分别对该蛋白的 B/T 细胞的优势抗原表位进行相关分析。采用的生物信息数据库和网站见表 1。

表 1 重要的生物信息数据库和网站
Table 1 Important bioinformatic databases and websites

名称 Name	网址 Websites
ProtParam	http://web. expasy. org/ protparam/
ProtScale	http://expasy. org/tools/ protscale. html/
SignalP 5. 0	https://services. healthtech. dtu. dk/ service. php? SignalP-5. 0/
TMHMM 2. 0	https://services. healthtech. dtu. dk/ service. php? TMHMM-2. 0/
NCBI ORF Finder Viewer	https://www. ncbi. nlm. nih. gov/ orffinder/
Prankweb	https://www. prankweb. cz/
Cell-Ploc 2. 0	http://www. csbio. sjtu. edu. cn/bioinf/ Cell-Ploc/
YinOYang 1. 2	https://services. healthtech. dtu. dk/ services/YinOYang-1. 2/
NetNGlyc 1. 0	https://services. healthtech. dtu. dk/ services/NetNGlyc-1. 0/
NetPhos 3. 1 MEGA11. 0	https://services. healthtech. dtu. dk/ services/NetPhos-3. 1/https://www. megasoftware. net/
IEDB	http://www. iedb. org/
SYFPEITHI Immunomedicine Group SAVES v6. 0	http://www. syfpeithi. de/ http://imed. ucm. es/Tools/antigenic. pl/ https://saves. mbi. ucla. edu/
SWISS-MODEL	https://swissmodel. expasy. org/
SOPMA	https://npsa-prabi. ibcp. fr/cgi-bin /
NCBI Conserved Domains	https://www. ncbi. nlm. nih. gov/ Structure/cdd/wrpsb. cgi/
Discovery Studio 2020	https://discovery. 3ds. com/
Pymol	https://pymol. org/2/

结 果

1 GP152 基因的开放阅读框

NCBI ORF Finder 分析 gp152 基因位于全基因组(NC_003310.1)的 148 842 -149 243 位,总长度为 402 bp。gp152 基因含有 3 个开放阅读框,ORF1 是最长的开放阅读框,起始密码子是“ATG”,终止密码子是“TAA”,总共编码 133 个氨基酸,与目的蛋白全长一致,表明 MPXV A42R 蛋白全长可完全表达(图 1)。MPXV A42R 蛋白氨基酸序列:MAEWHKIIEDISKNNKFEDAAIVDYKTTKNVLAAPNRTFAKINPGEVIPLITNHNILKPLIGQKFCIVYTNSLMDENTYAMELLTGYPVSPIVIARTHTALIFLMGKPTTSRRDVYRTCRDHATRVRATGN。

2 A42R 蛋白的同源及系统进化分析

从 NCBI Genbank 获取 9 个不同物种 A42R 蛋白的氨基酸序列,使用 ClustalW2.1 进行比对分析(图 2A)。A42R 蛋白的同源性对比矩阵结果表明,猴痘病毒 2022 毒株(MPXV-2022)和猴痘病毒扎伊尔毒株(MPXV-Zaire)、天花病毒(variola virus,VARV)、痘苗病毒(vaccinia virus,VACV)、牛痘病毒(cowpox

virus,CPXV)、骆驼痘病毒(camelpox virus,CMLV)、鼠痘病毒(ectromelia virus,ECTV)、浣熊痘病毒(raccoonpox virus,RCNV)、臭鼬痘病毒(skunkpox virus,SKPV)的同源性分别为 100%、98.50%、96.99%、97.74%、99.25%、90.98%、81.20% 和 78.95%(图 3)。系统发育进化树显示,两种猴痘病毒毒株与天花病毒亲缘关系最近,其次是骆驼痘病毒、痘苗病毒、牛痘病毒及鼠痘病毒,浣熊痘病毒与臭鼬痘病毒构成一小分支,猴痘病毒距离该分支较远(图 2B)。

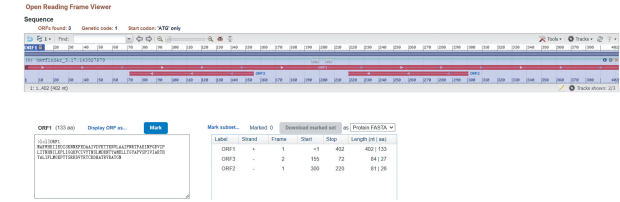
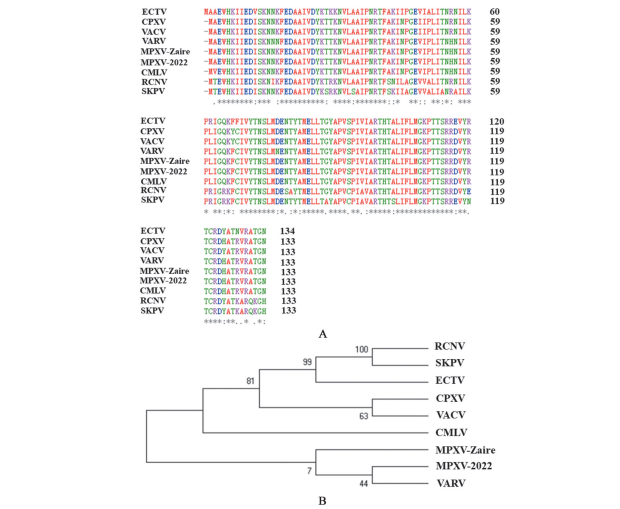


图 1 MPXV gp152 基因的开放阅读框分析
Fig. 1 Open reading frame analysis of MPXV gp152 gene



A 氨基酸比对 B 系统进化树
图 2 不同物种 A42R 蛋白的同源性比对及系统进化分析
A Amino acid sequences alignment B Phylogenetic tree
Fig. 2 Homologous analysis of CrmB in different species

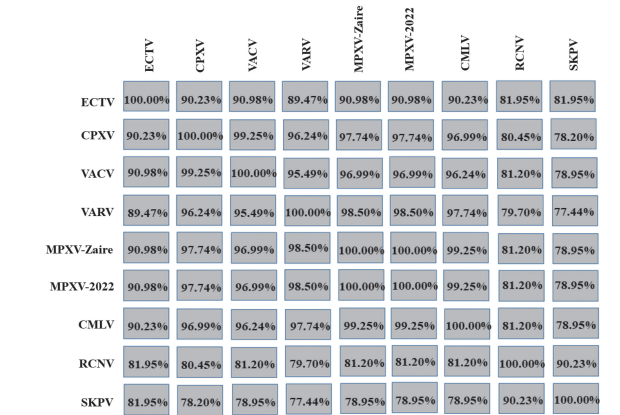


图 3 不同物种 A42R 蛋白的百分比一致性矩阵
Fig. 3 Percent identity matrix of A42R in different species

3 A42R 蛋白的理化性质和亲/疏水性

利用 ExPasy 网站下 ProtParam 对 MPXV A42R 蛋白进行分析。结果显示, A42R 蛋白由 133 个氨基酸组成, 包含带正电荷的氨基酸残基(Arg + Lys) 17 个和负电荷的氨基酸残基(Asp + Glu) 12 个; 分子质量为 15.003 42 ku, 分子式为 $C_{670}H_{1078}N_{186}O_{192}S_6$, 总的原子数为 2 132; 理论等电点为 9.36, 消光系数为 13 075, 半衰期是 30 h, 不稳定系数为 27.23, 属于稳定蛋白; 脂肪系数为 93.91, 亲水性平均值为 -0.164。构成 A42R 蛋白的氨基酸总共有 20 种, 其中含量最多的是异亮氨酸(Ile)和苏氨酸(Thr), 占 10.5%; 含量最少的是谷氨酰胺(Gln)和色氨酸(Trp), 占 0.8%; 不含吡咯赖氨酸(Pyl)和硒半胱氨酸(Sec)(表 2)。

运用 ExPasy 网站下 ProtScale 分析 A42R 蛋白的亲/疏水性, 疏水性用大于 0 的正数表示, 亲水性用小于 0 的负数表示。结果表明, 最强的亲水氨基酸是第 112 位的苏氨酸(Thr), 亲水值为 -2.289; 最强的疏水氨基酸是第 93 位的脯氨酸(Pro), 疏水值为 1.889; 总的亲水值为 -60.061, 总的疏水值为 43.788, 推测 A42R 蛋白属于亲水性蛋白(图 4)。

表 2 A42R 蛋白的氨基酸组成
Table 2 Amino acid composition of A42R protein

氨基酸	数量	百分比(%)	氨基酸	数量	百分比(%)
Amino acid	Quantity	Percentage	Amino acid	Quantity	Percentage
Ala	12	9.00	Leu	9	6.80
Arg	8	6.00	Lys	9	6.80
Asn	10	7.50	Met	4	3.00
Asp	6	4.50	Phe	4	3.00
Cys	2	1.50	Pro	7	5.30
Gln	1	0.80	Ser	4	3.00
Glu	6	4.50	Thr	14	10.50
Gly	5	3.80	Trp	1	0.80
His	4	3.00	Tyr	5	3.80
Ile	14	10.50	Val	8	6.00
Pyl	0	0.00	Sec	0	0.00

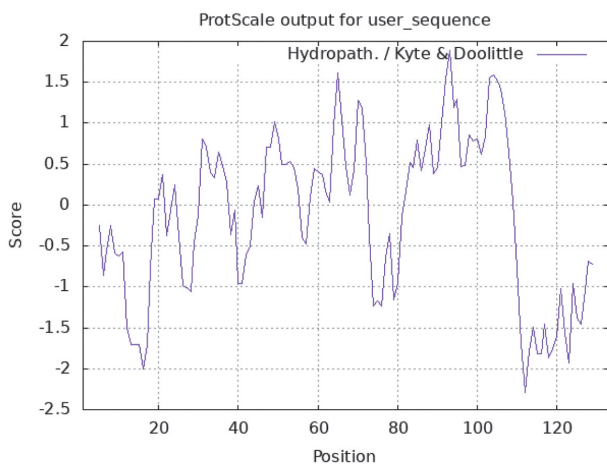


图 4 A42R 蛋白的亲/疏水性分析
Fig. 4 Hydropathicity/Hydrophobicity analysis of A42R

4 A42R 蛋白的信号肽、跨膜结构、亚细胞定位和功能结构域

运用 SignalP5.0 Serve 网站对 MPXV A42R 蛋白的信号肽进行预测, 结果显示该蛋白存在信号肽的概率为 0.0005, 推测 A42R 蛋白不存在信号肽序列, 不属于分泌性蛋白(图 5)。运用 TMHMM Serve2.0 预测 A42R 蛋白的跨膜区, 结果表明该蛋白位于膜外, 跨膜螺旋数量为 0, 即不存在跨膜结构, 是非跨膜蛋白(图 6)。

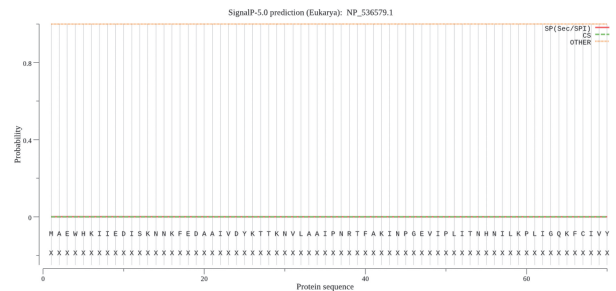


图 5 A42R 蛋白的信号肽分析
Fig. 5 Signal peptide analysis of A42R

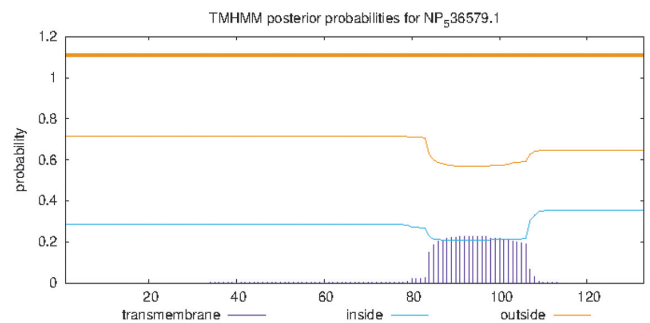


图 6 A42R 蛋白的跨膜区域分析
Fig. 6 Transmembrane domain analysis of A42R

运用 Cell-Ploc2.0 网站预测 A42R 蛋白的亚细胞定位, 结果显示该蛋白主要在宿主细胞的细胞质膜上发挥重要作用。NCBI Conserved Domains 预测 A42R 蛋白的 2-133 位氨基酸序列都属于 PROF 超家族, 该家族可以结合肌动蛋白单体、膜中多磷酸肌醇和聚 L-脯氨酸。Profilin 可以通过结合肌动蛋白单体和末端 F-肌动蛋白亚基来抑制肌动蛋白的聚合, 但是作为细胞骨架的调节剂, 也可以促进肌动蛋白的聚合, 在分支肌动蛋白纤维网络的组装中发挥作用(图 7)。

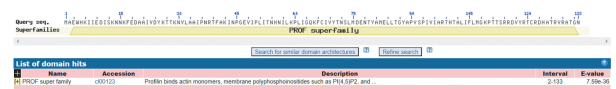


图 7 A42R 蛋白的结构域分析
Fig. 7 Conserved domain analysis of A42R

5 A42R 蛋白的二、三级结构

利用 SOPMA 网站预测 A42R 蛋白的二级结构,

结果显示 A42R 蛋白多肽链中存在 38 个 α -螺旋, 占 28.57%, 38 个延伸片段, 占 28.57%; 48 个无规则卷曲, 占 36.09%; 9 个 β -转角, 占 6.77% (图 8)。

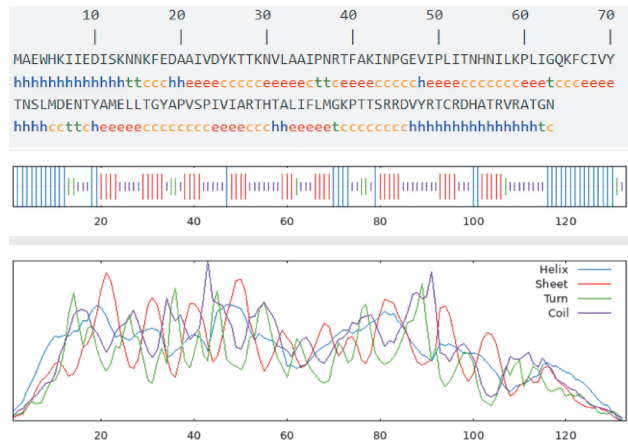


图 8 A42R 蛋白的二级结构分析
Fig. 8 Secondary structure analysis of A42R

运用 SWISS-MODEL 在线网站预测 A42R 蛋白的三级结构, 构建出 2 个同源模型 (A 和 B)。根据 GMQE 和 QMEAN 数值大小选择置信度最高的 A42R 蛋白的三级结构模型 A, 其中 GMQE 分值是 0.96, QMEAN 分值是 0.91。运用 SAVES v6.0 网站的拉曼光谱图验证三级结构模型 A 的可靠性, 模型 A 拉曼光谱图显示 89.9% 氨基酸残基都在最容许的区域, 表明模型 A 具有较好的可信度 (图 9)。

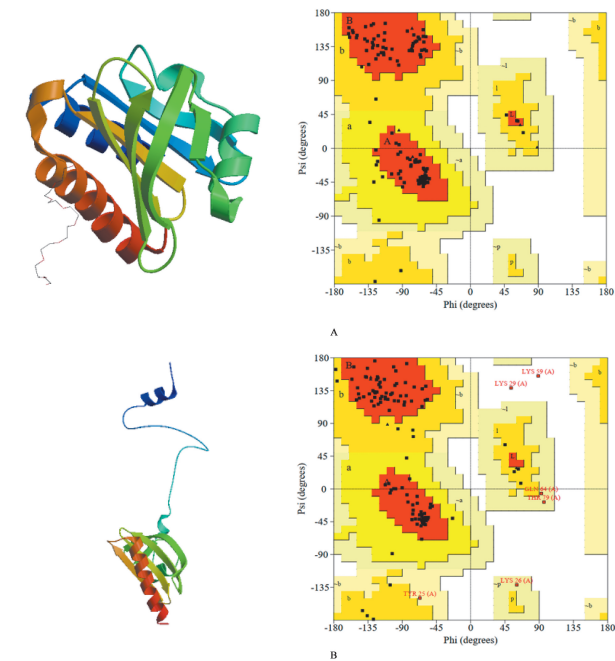


图 9 A42R 蛋白的三级结构
Fig. 9 Tertiary structure protein of A42R protein

6 A42R 蛋白的糖基化位点和磷酸化位点

运用 YinOYang1. 2、NetNGlyc1. 0、NetPhos3. 1

在线软件分别对 A42R 蛋白 O-糖基化、N-糖基化、磷酸化位点进行分析, 结果显示 A42R 有 2 个 O-糖基化位点, 位于第 92 位和第 112 位的氨基酸 (图 10); 有 1 个 N-糖基化位点, 位于第 37 位的氨基酸 (图 11); 有 14 个磷酸化位点, 包括丝氨酸 (S) 位点 3 个, 苏氨酸 (T) 位点 9 个和酪氨酸 (Y) 位点 2 个, 能被 PKC、UNSP、CKII、DNAPK、SRC、INSR、CDK5、P38 等激酶磷酸化 (图 12)。

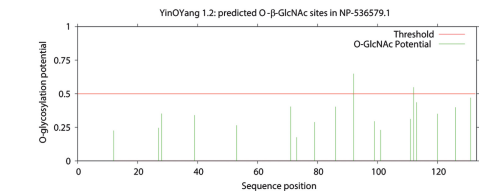


图 10 A42R 蛋白的 O-糖基化位点分析
Fig. 10 O-glycosylation sites analysis of A42R protein

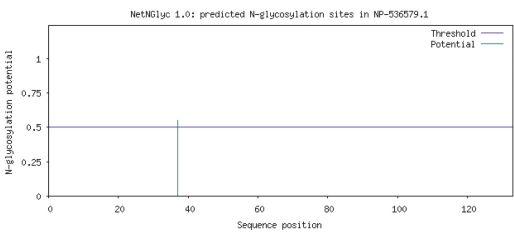


图 11 A42R 蛋白的 N-糖基化位点分析
Fig. 11 N-glycosylation sites analysis of A42R protein

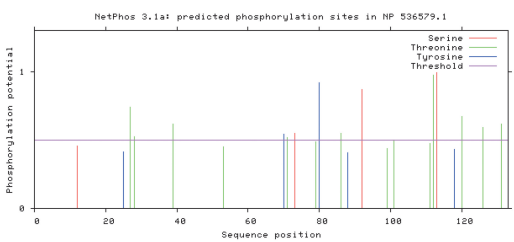


图 12 A42R 蛋白的磷酸化位点分析
Fig. 12 Phosphorylation sites analysis of A42R protein

7 A42R 蛋白的 B/T 细胞抗原表位

运用 IEDB 网站, 基于 Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 预测 A42R 的 B 细胞表位的抗原性, 阈值为 0.500, 结果显示 N 端的 5-17、37-45、72-78、86-88、109-117 区域为可能的 B 细胞抗原表位 (图 13A); 基于 Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity 预测 A42R 的 B 细胞表位的抗原性, 阈值为 1.026, 结果显示 N 端的 20-25、30-35、58-72、86-98、101-107 区域的抗原性较强 (图 13B)。

运用 SYFPEITHI 网站对 A42R 蛋白的 T 细胞表位进行分析, 其中选取 MHC 分子亚型 HLA-A * 02:01 限制性 CTL 表位, 分值大于 15, 预测到 23 个 CTL 细胞优势表位 (表 3); MHC 分子亚型 RT1. AI

辅助性 Th 细胞表位, 分值大于 10, 检测到 16 个 Th 细胞表位(表 4)。

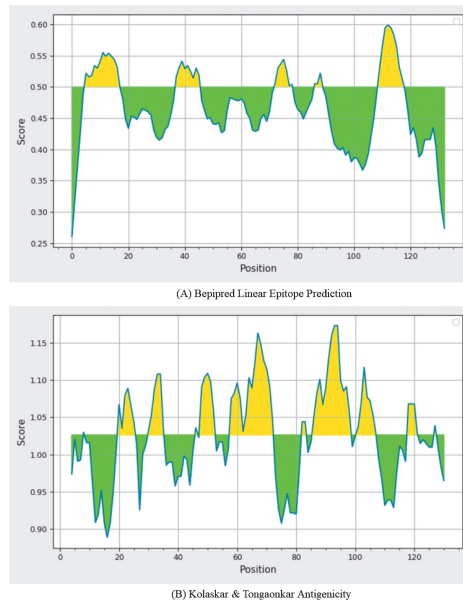


图 13 A42R 蛋白的 B 细胞抗原表位分析
Fig. 13 B-cell antigen epitopes analysis of A42R protein

表 3 A42R 蛋白 CTL 细胞优势表位分析
Table 3 Analysis of dominant epitopes of A42R in CTL cells

序号 No.	起始位置 Start position	序列 Sequence	分数 Score
1	83	ELLTGYPV	23
2	95	VIARTHTAL	22
3	61	LIGQKFCIV	21
4	50	PLITNHNIL	20
5	74	LMDENTYAM	20
6	6	KHEDISK	19
7	60	PLIGQKFCI	19
8	66	FCIVYTNSL	19
9	27	TTKNVLA	18
10	31	VLAaipnrt	18
11	43	INPGEVIPL	18
12	57	ILKPLIGQK	18
13	73	SLMDENTYA	18
14	96	IARTHTALI	18
15	98	RTHTALIFL	18
16	94	IVIARTHTA	17
17	105	FLMGKPTTS	17
18	40	FAKINPGEV	16
19	42	KINPGEVIP	16
20	56	NILKPLIGQ	16
21	81	AMELLTGYA	16
22	87	GYAPVSPIV	16
23	102	ALFLMGKP	16

8 A42R 蛋白的抗原决定簇

运用 Immunomedicine Group 网站对 A42R 蛋白的抗原决定簇进行预测, 平均抗原倾向性为 1.0214, 共计有 6 个抗原决定簇表位, 主要位于氨基酸序列的 18-25、28-34、44-54、56-71、81-106、117-127 位点, 这些

位点形成抗原决定簇的可能性较高(图 14)。

表 4 A42R 蛋白 Th 细胞优势表位分析
Table 4 Analysis of dominant epitopes of A42R in Th cells

序号 No.	起始位置 Start position	序列 Sequence	分数 Score
1	72	NSLMDENTY	24
2	32	LAAIPNRTF	17
3	80	YAMELLTGY	17
4	116	DVYRTRCDH	17
5	68	IVYTNSLMD	16
6	101	TALIFLMGK	13
7	15	NKFEDAAIV	12
8	30	NVLAAIPNR	12
9	62	IGQKFCIVY	12
10	110	PTTSRRDVY	12
11	17	FEDAAIVDY	11
12	23	VDYKTTKNV	11
13	58	LKPLIGQKF	11
14	64	QKFCIVYTN	11
15	97	ARTHTALIF	11
16	103	LIFLMGKPT	11

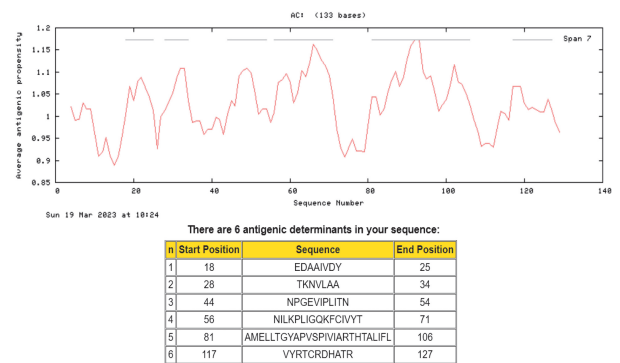


图 14 A42R 蛋白抗原决定簇预测
Fig. 14 Prediction of A42R antigen epitopes

9 A42R 蛋白的配体结合位点和分子对接分析

运用 Prankweb 网站预测 MPXV A42R 蛋白的配体结合位点, 结果如图 15。其中在序列可视化窗口中, 8 种不同颜色的图形分别代表预测的蛋白质口袋结构和实际配体相结合的潜在序列位置区域; 结构可视化窗口中, 该蛋白表面也用不同颜色表示每个口袋区域, 灰色代表保守性区域, 灰色越深表示保守性越高。表 5 显示, 黑色区域(Pocket 1)口袋分值为 4.06, Rank 为 1, 大于其它颜色区域的口袋分值, 推测黑色区域是最大可能的配体结合区域, 其概率可能性分值为 0.173, 氨基酸残基数目为 10, 保守性分值 2.680。

对 SWISS-MODEL 同源建模的 A42R 蛋白晶体结构进行预处理, 然后将准备好的配体小分子利用 Discovery Studio 2020 分子模拟软件中的 Libdock 模块进行分子对接虚拟筛选, 按照 Score 大小为依据进行排序, 分值越高表明该小分子化合物和 A42R 蛋白的相互作用越紧密, 结果得到 Top20 的小分子化合

物。然后利用 PyRx 软件内部的 Vina 进行二次分子对接,选择结合能最低(结合能越低,结合越好)的 Top5 FDA 西药化合物(表 6)和 Top5 中药单体化合物(表 7)进行对接结合,使用 Pymol 进行可视化分析,结果如图 16。

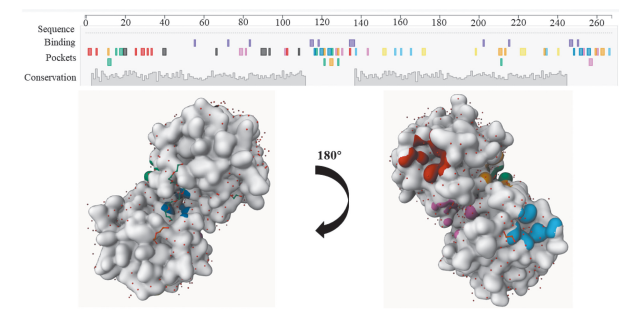


图 15 A42R 蛋白的配体结合区分析
Fig. 15 Analysis ligand binding sites of A42R

表 5 A42R 蛋白的配体结合区分析
Table 5 Ligand binding sites analysis of A42R

口袋排名 Pocket rank	口袋分数 Pocket score	可能性分数 Probability score	数目 AA count	保守性 Conservation	残基位置 Residues
1	4.06	0.173	10	2.680	A_107,A_18,A_19,A_38,A_39,A_65,A_88,A_89,A_90,A_92
2	3.73	0.150	10	2.006	A_0,A_1,A_101,A_133,A_24,A_27,A_28,A_30,A_32,A_4
3	3.57	0.138	9	2.780	B_107,B_18,B_19,B_38,B_39,B_65,B_88,B_89,B_90
4	3.06	0.103	12	0.813	A_10,A_120,A_123,A_124,A_127,B_100,B_126,B_129,B_130,B_77,B_78,B_80
5	2.99	0.099	6	2.741	B_101,B_133,B_24,B_27,B_32,B_4
6	2.40	0.064	10	1.342	A_10,A_11,A_116,A_120,A_124,A_127,A_14,A_16,A_17,B_78
7	2.39	0.064	10	1.001	A_115,A_118,A_119,A_122,A_123,B_115,B_118,B_119,B_122,B_123
8	2.23	0.054	11	0.878	A_100,A_126,A_129,A_77,A_78,A_80,B_10,B_120,B_123,B_124,B_127

表 6 A42R 蛋白的 Top5 西药化合物
Table 6 Top5 western medicine compounds of A42R

排名 Rank	配体 Ligand	结合能 Affinity kcal/mol	化合物 ID 号 Pubchem CID	分子质量 Molecular Weight g/mol
1	Nadide	-7.1	5892	663.4
2	Flavitan	-7.1	643975	785.5
3	Tannic acid	-6.9	16129778	1701.2
4	Pralmorelin hydrochloride	-6.6	9940988	890.9
5	Nelfinavir	-6.5	64143	567.8

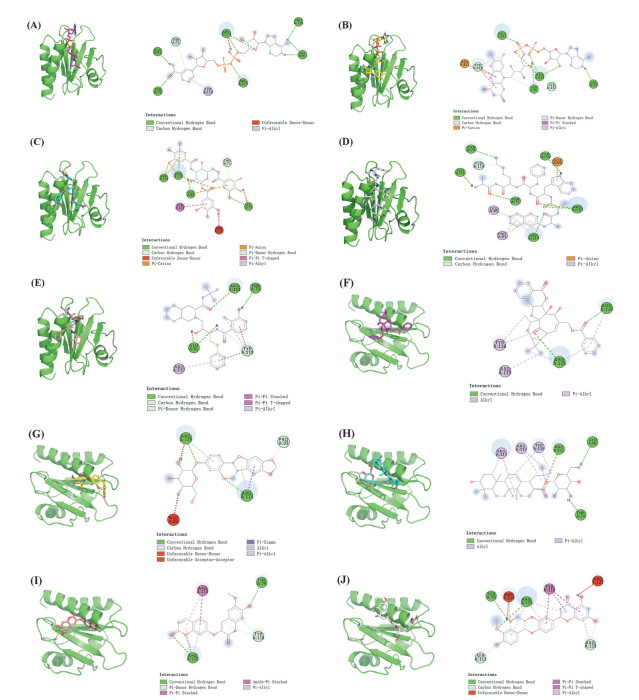
讨论

迄今为止,MPXV 天然动物宿主在很大程度上仍不确定。在自然界多个动物中,MPXV 的动物宿主包括绳松鼠、树松鼠、条纹小鼠、睡鼠、冈比亚袋鼠、白眉猴、黑猩猩等以及其它非人灵长类动物^[20-21]。MPXV

不仅可从动物传播给人类,也可通过直接接触、呼吸道飞沫或病原体从人类传播给人类。有临床研究显示,与未接种过天花疫苗的人相比,接种过天花疫苗者能较好地预防 MPXV 或发展为症状较轻的疾病^[22]。但是该疫苗不建议在大规模人群中接种,只被推荐用于高危人群,因为只能提供 85% 的有效保护。自 1980 年世界宣布根除天花以来,我国停止接种天花疫苗 30 余年,即便是以前接种过的人,随着时间的推移也有一定的感染风险。鉴于 MPXV 存在持续进化的迹象,本研究采用生物信息学方法对 MPXV A42R 进行分析,其中包括开放阅读框、序列同源性、糖基化、磷酸化位点、蛋白空间结构、抗原表位、配体结合区域以及小分子化合物等。

表 7 A42R 蛋白的 Top5 中药单体化合物
Table 7 Top5 natural compounds of A42R

排名 Rank	配体 Ligand	结合能 Affinity kcal/mol	化合物 ID 号 Pubchem CID	分子质量 Molecular Weight g/mol
1	HY-137295	-7.3	162166	556.6
2	HY-N0616	-6.9	442827	446.4
3	HY-N7635	-6.9	14189384	618.8
4	HY-N0699	-6.8	5281406	352.3
5	HY-N7199	-6.7	5489114	464.4



A 辅酶 A B 核黄素 C 丹宁酸 D 盐酸普拉莫林 E 奈非那韦 F 二苯甲酸 G 三叶豆紫檀苷 H 齐墩果酸 beta-D-吡喃葡萄糖基酯 I 西瑞香素 J 次大风子素

图 16 A42R 蛋白和化合物的分子对接

A Nadide B Flavtin C Tannic acid D Pralmorelin hydrochloride E Nelfinavir F Ingenol dibenzoate G Trifolirhizin H Oleanolic acid beta-D-glucopyranosyl ester I Daphnoretin J Hydnocarpin

Fig. 16 Molecular docking of A42R and compounds

MPXV A42R 是一种参与 F-肌动蛋白组装和调节的肌动蛋白结合蛋白,在 MPXV 感染周期中的作用尚不清楚^[23]。本研究对 MPXV-2022、MPXV-Zaire、VARV、VACV、CPXV、CMLV、ECTV、RCNV 和 SKPV 进行序列比对分析,结果显示这 9 个物种中 A42R 蛋白具有高度的相似性,其中 MPXV-2022 和 CPXV、VACV、VARV、MPXV-Zaire、CMLV 的同源性分别为 97.74%、96.99%、98.50%、100.00%、99.25%,表明 A42R 是一种高保守性蛋白,可用作诊断的标记蛋白。目前,实时荧光定量 PCR 或常规 PCR 依然是检测人类 MPXV 的首选方法,靶基因通常是 DNA 多聚酶基因(E9L)、DNA 依赖性 RNA 多聚酶 18 基因(RP018)、细胞外包膜蛋白基因(B6R)和补体结合蛋白(3CL)等^[24]。同时,系统发育进化树也表明 MPXV-2022、MPXV-Zaire、VARV 同处在一个大分支,表明三者亲缘关系较近。因此,MPXV 和 VARV 在生物学特性、形态结构和抗原性等方面具有很高的相似性,而 MPXV 比 VARV 具有更广泛的宿主和潜在的传播力^[25]。最近一项研究报道,MPXV 被发现在人与犬之间传播^[26]。

MPXV 基因组大小约 197 kb,包含大约 190 个不重叠的开放阅读框,编码大于 200 个蛋白质。本研究分析 MPXV gp152 基因包含 3 个开放阅读框,ORF1 是最具编码蛋白潜能的序列,A42R 蛋白被完全表达。A42R 蛋白属于 PROF 超家族,主要在宿主细胞的细胞质膜上发挥作用,但 Signal5.0 和 TMHMM2.0 网站均预测其不存在跨膜结构和信号肽,推测此蛋白并不直接负责向宿主细胞进行迁移、粘附和囊泡运输。理化性质预测显示,A42R 蛋白由 133 个氨基酸构成,理论等电点为 9.36,属于碱性蛋白质,与其带正电荷的氨基酸数目大于带负电荷数目相一致。A42R 半衰期为 30 h,不稳定系数为 27.23,属于稳定蛋白,与 MPXV 能抗干燥和低温并且在 4℃ 下可长时间保持活力相符。A42R 为亲水性蛋白,该蛋白的氢键和疏水性表面会吸引大量的水分子,形成氢键网路,保持该蛋白质的稳定性以发挥其功能作用。

从 MPXV A42R 蛋白的结构上分析,二级结构的无规则卷曲所占比例最高(36.09%),由于无规则卷曲大量散布在蛋白中,使得空间结构容易发生改变,口袋结构更易于与其它小分子化合物相结合。拉曼光谱图验证三级结构模型 A 具有较好的可靠性,89.9%的氨基酸残基位于最容许的深红色区,10.1%的氨基酸残基位于额外容许的深黄色区。不对称单元模型 A 由 2 条多肽链组成,整体形成一个 7 股反平行 β 片,与 Minasov 等^[27]报道的 A42R 蛋白衍射结构模型相一致,推测此 Profilin 样蛋白在改变细胞内病毒复制的

肌动蛋白动力学过程中发挥作用。本研究预测 A42R 蛋白存在 2 个 O-糖基化位点、1 个 N-糖基化位点和 14 个磷酸化位点,然而鲜有关于修饰位点的研究报道,这些修饰位点可能会改变蛋白质结构和功能,有待于进一步验证。

MPXV 感染的临床症状一般轻微和自限,一般采用支持性治疗,目前还没有特效疗法。然而在某些病人,如患有严重系统疾病、免疫功能低下、孕妇和儿童,可能需要特殊疗法,但多数患者只能依靠抗天花病毒药物进行治疗^[28-29]。本研究对 MPXV A42R 蛋白的配体结合位点和小分子化合物综合分析,得到 8 个配体结合区域和 10 个可能的西药和中药化合物,其中黑色区域(Pocket 1)是可能性最大的,这将有利于新药设计。Cidofovir 也称为 Vistide,是一种前体药物,在体外和动物模型研究中显示能抑制病毒的 DNA 多聚酶,对抗痘病毒有一定效果,但具有肾毒性和致癌性^[30]。Tecovirimat(ST-246,TPOXX)^[31]也是用于治疗天花的抗病毒药物,已被美国食品和药品管理局(food and drug administration,FDA)批准用于治疗疫情期间的猴痘。Brincidofovir(CMX-001)^[32]是一种改良的 Cidofovir 化合物,相比 Cidofovir 对肾脏毒性较小,已经证明其具有抗正痘病毒活性。疫苗注射免疫球蛋白(vaccinia immune globulin intravenous,VIGIV)^[33]也是 FDA 批准的一种药物,美国疾控中心允许在疫情爆发期间用于治疗猴痘,但是关于治疗病毒感染的有效数据还无法统计。

本研究基于不同算法对 A42R 蛋白的 B 细胞抗原表位进行预测,分别筛选出 5 个最可能的抗原表位。同时,使用 SYFPEITHI 网站预测出 23 个 CTL 细胞抗原优势表位和 16 个 Th 细胞优势表位,还证实 A42R 蛋白可能存在 6 个抗原决定簇表位,可为 MPXV 疫苗的研发提供参考,以替代第二代正痘病毒活疫苗 ACAM2000 以及第三代减毒疫苗 JYNNEOS,因为 ACAM2000^[34]为活疫苗,具有复制能力,有发生严重不良事件的风险,还可引起心肌炎和心包炎。JYNNEOS^[35]疫苗是一种复制缺陷的疫苗,还需要大量的临床试验数据证明其安全性和有效性。

Spicknall 等^[36]报道从精液中检出 MPXV,大量确诊 MPXV 的男性患者来自男男性行为者,因此 MPXV 在全球将如何演变尚不清楚。为了防范可能出现的猴痘爆发疫情,本研究借助生物信息学工具重点分析了 MPXV A42R 蛋白的结构特征、预测了多个潜在的 B/T 细胞抗原表位、配体结合位点和小分子化合物,可为新药和疫苗研发提供一定的理论依据。

- [1] Gong Q, Wang C, Chuai X, et al. Monkeypox virus: a re-emergent threat to humans[J]. *Virol Sin*, 2022, 37(4): 477-482.
- [2] Babkin IV, Babkina IN. The origin of the variola virus[J]. *Viruses*, 2015, 7(3): 1100-1112.
- [3] Diaz-Canova D, Mavian C, Brinkmann A, et al. Genomic sequencing and phylogenomics of Cowpox Virus[J]. *Viruses*, 2022, 14(10): 2134.
- [4] Geessien KE, Santos AJ, De STG, et al. Natural vaccinia virus infection: diagnosis, isolation, and characterization [J]. *Curr Protoc Microbiol*, 2016, 42: 14A. 5. 1-14A. 5. 43.
- [5] Saxena SK, Ansari S, Maurya VK, et al. Re-emerging human monkeypox; a major public-health debacle[J]. *J Med Virol*, 2023, 95(1): e27902.
- [6] Shah HH, Molani MK, Shabbir N. Human monkeypox-After 40 years, an unintended consequence of smallpox eradication[J]. *Front Public Health*, 2023, 10: 1082586.
- [7] Petersen E, Kantele A, Koopmans M, et al. Human monkeypox; epidemiologic and clinical characteristics, diagnosis, and prevention [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2019, 33(4): 1027-1043.
- [8] Lai CC, Hsu CK, Yen MY, et al. Monkeypox; an emerging global threat during the COVID-19 pandemic[J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2022, 55(5): 787-794.
- [9] Bunge EM, Hoet B, Chen L, et al. The changing epidemiology of human monkeypox-a potential threat? A systematic review[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2022, 16(2): e0010141.
- [10] Karagoz A, Tombuloglu H, Alsaeed M, et al. Monkeypox (mpox) virus: classification, origin, transmission, genome organization, antiviral drugs, and molecular diagnosis [J]. *J Infect Public Health*, 2023, 16(4): 531-541.
- [11] Dimitrakoff J. Monkeypox virus infection across 16 countries-April-June 2022[J]. *N Engl J Med*, 2022, 387(25): e69.
- [12] McCarthy MW. Recent advances in the diagnosis monkeypox; implications for public health [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2022, 22(7): 739-744.
- [13] Alakunle E, Moens U, Nchinda G, et al. Monkeypox virus in Nigeria; infection biology, epidemiology, and evolution [J]. *Viruses*, 2020, 12(11): 1257.
- [14] Patel A, Bilinska J, Tam JCH, et al. Clinical features and novel presentations of human monkeypox in a central London centre during the 2022 outbreak; descriptive case series [J]. *BMJ*, 2022, 378: e072410.
- [15] Arndt WD, Cotsmire S, Trainor K, et al. Evasion of the innate immune type I interferon system by monkeypox virus [J]. *J Virol*, 2015, 89(20): 10489-10499.
- [16] Fernández De Marco Mdel M, Alejo A, Hudson P, et al. The highly virulent variola and monkeypox viruses express secreted inhibitors of type I interferon [J]. *FASEB J*, 2010, 24(5): 1479-1488.
- [17] Isidro J, Borges V, Pinto M, et al. Phylogenomic characterization and signs of microevolution in the 2022 multi-country outbreak of monkeypox virus [J]. *Nat Med*, 2022, 28(8): 1569-1572.
- [18] Ma Y, Chen M, Bao Y, et al. MPoxVR: A comprehensive genomic resource for monkeypox virus variant surveillance [J]. *Innovation (Camb)*, 2022, 3(5): 100296.
- [19] Abbasi J. Reports of asymptomatic monkeypox suggest that, at the very least, some infections go unnoticed [J]. *JAMA*, 2022, 328(11): 1023-1025.
- [20] Chakraborty C, Bhattacharya M, Nandi SS, et al. Appearance and re-appearance of zoonotic disease during the pandemic period; long-term monitoring and analysis of zoonosis is crucial to confirm the animal origin of SARS-CoV-2 and monkeypox virus [J]. *Vet Q*, 2022, 42(1): 119-124.
- [21] Guagliardo SAJ, Monroe B, Moundjoa C, et al. Asymptomatic orthopoxvirus circulation in humans in the wake of a monkeypox outbreak among chimpanzees in cameroon [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2020, 102(1): 206-212.
- [22] Kennedy RB, Ovsyannikova IG, Haralambieva IH, et al. Proteomic assessment of humoral immune responses in smallpox vaccine recipients [J]. *Vaccine*, 2022, 40(5): 789-797.
- [23] Preet G, Oluwabusola ET, Milne BF, et al. Computational repurposing of mitoxantrone-related structures against monkeypox virus; a molecular docking and 3D pharmacophore study [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22): 14287.
- [24] Maksyutov RA, Gavrilova EV, Shchelkunov SN. Species-specific differentiation of variola, monkeypox, and varicella-zoster viruses by multiplex real-time PCR assay [J]. *J Virol Methods*, 2016, 236: 215-220.
- [25] Reynolds MG, Doty JB, McCollum AM, et al. Monkeypox re-emergence in Africa; a call to expand the concept and practice of one health [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2019, 17(2): 129-139.
- [26] Seang S, Burrell S, Todesco E, et al. Evidence of human-to-dog transmission of monkeypox virus [J]. *Lancet*, 2022, 400(10353): 658-659.
- [27] Minasov G, Inniss NL, Shuvalova L, et al. Structure of the monkeypox virus profilin-like protein A42R reveals potential functional differences from cellular profilins [J]. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 2022, 78(10): 371-377.
- [28] Adler H, Gould S, Hine P, et al. Clinical features and management of human monkeypox; a retrospective observational study in the UK [J]. *Lancet Infect Dis*, 2022, 22(8): 1153-1162.
- [29] Cheema AY, Ogedegbe OJ, Munir M, et al. Monkeypox; a review of clinical features, diagnosis, and treatment [J]. *Cureus*, 2022, 14(7): e26756.
- [30] De Clercq E. Cidofovir in the treatment of poxvirus infections [J]. *Antiviral Res*, 2002, 55(1): 1-13.
- [31] Russo AT, Grosenbach DW, Chinsangaram J, et al. An overview of tecovirimat for smallpox treatment and expanded anti-orthopoxvirus applications [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2021, 19(3): 331-344.
- [32] Hutson CL, Kondas AV, Mauldin MR, et al. Pharmacokinetics and efficacy of a potential smallpox therapeutic, brincidofovir, in a lethal monkeypox virus animal model [J]. *mSphere*, 2021, 6(1): e00927-20.
- [33] Whitehouse ER, Rao AK, Yu YC, et al. Novel treatment of a vaccinia virus infection from an occupational needlestick-San Diego, California, 2019 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2019, 68(42): 943-946.
- [34] Decker MD, Garman PM, Hughes H, et al. Enhanced safety surveillance study of ACAM2000 smallpox vaccine among US military service members [J]. *Vaccine*, 2021, 39(39): 5541-5547.
- [35] Meo SA, Al-Masri AA, Klonoff DC, et al. Comparison of biological, pharmacological characteristics, indications, contraindications and adverse effects of JYNNEOS and ACAM2000 monkeypox vaccines [J]. *Vaccines (Basel)*, 2022, 10(11): 1971.
- [36] Spicknall IH, Pollock ED, Clay PA, et al. Modeling the impact of sexual networks in the transmission of monkeypox virus among gay, bisexual, and other men who have sex with men-United States, 2022 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2022, 71(35): 1131-1135.