

DOI:10.13350/j.cjpb.240401

• 论著 •

猴痘病毒 A29L 蛋白的生物信息学分析*

张郁勃, 葛萧, 沈方园, 周慧姿, 张晓宇, 李恒**

(潍坊医学院医学检验学院, 山东潍坊 261053)

【摘要】 目的 运用生物信息学分析软件对猴痘病毒 A29L 蛋白的结构和功能进行预测。方法 从 NCBI 网站上获取猴痘病毒 A29L 基因及编码 A29L 蛋白的基本信息, 利用 NCBI、OFR Finder、ProtParam、ProtScaleon Expasy、SignalP 4.1、TMHMM-2.0、NetPhos 3.1 Sever、SOPMA、SWISS-MODEL、ABCpred、SYFPEITHI、BLAST 等生物信息学工具对猴痘病毒 A29L 蛋白的结构和功能进行预测。结果 A29L 蛋白是由 110 个氨基酸组成的亲水性蛋白, 含有 19 种氨基酸, 2 个开放阅读框。A29L 蛋白相对分子质量为 12.55924×10^3 , 理论等电点 5.73, 不稳定系数 32.28, 是稳定蛋白。A29L 蛋白存在 10 个磷酸化位点, 无跨膜区、信号肽; A29L 蛋白二级结构中 α -螺旋占比最高, 占 57.27%, 无规则卷占 32.73%; B 细胞有 11 个 (score > 0.5) 抗原表位, CTL 细胞有 6 个 (score ≥ 21) 抗原表位, Th 细胞有 10 个 (score ≥ 20) 抗原表位。A29L 蛋白有 8 个同源性较高的蛋白。结论 A29L 蛋白是具有多个潜在的 T、B 细胞抗原表位的稳定亲水性蛋白, 可作为猴痘治疗和疫苗的候选蛋白。

【关键词】 猴痘病毒; A29L 蛋白; 疫苗; 生物信息学

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2024)04-0373-05

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Apr.; 19(4): 373-377.]

Bioinformatics analysis of monkeypox virus A29L protein

ZHANG Yubo, GE Xiao, SHEN Fangyuan, ZHOU Huizi, ZHANG Xiaoyu, LI Heng (Department of Medical Laboratory, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong, China)

【Abstract】 **Objective** To predict the structure and function of the monkeypox virus A29L protein using bioinformatics analysis software. **Methods** The basic information of monkeypox virus A29L gene and encoded A29L protein was obtained from NCBI website, and the structure and function of monkeypox virus A29L protein were predicted using bioinformatics tools such as NCBI, OFR Finder, ProtParam, ProtScaleon Expasy, SignalP 4.1 Sever, TMHMM-2.0, NetPhos 3.1 Sever, SOPMA, SWISS-MODEL, ABCpred, SYFPEITHI, and BLAST. **Results** A29L protein is a hydrophilic protein composed of 110 amino acids, containing 19 kinds of amino acids and 2 open reading frames. The relative molecular mass of A29L protein is 12.55924×10^3 , the theoretical isoelectric point is 5.73, and the instability coefficient is 32.28. It is a stable protein. The A29L protein has 10 phosphorylation sites, no transmembrane region and no signal peptide. The A29L protein has the highest proportion of α -helices (57.27%) and irregular coils (32.73%) in the secondary structure. 11 (score > 0.5) antigenic epitopes were found in B cells, 6 (score ≥ 21) in CTL cells and 10 (score ≥ 20) in Th cells. A29L protein has 8 proteins with high homology. **Conclusion** The A29L protein is a stable hydrophilic protein with multiple potential T and B cell antigenic epitopes and could be a candidate protein for monkeypox treatment and vaccine.

【Key words】 Monkeypox virus; A29L protein; vaccine; bioinformatics

*** 猴痘病是一种人畜共患传染病, 其主要宿主、传播方式和维持周期尚未完全确定^[1]。猴痘根据遗传和表型差异分为中非分支和西非分支, 中非分支的传染性和毒力较强^[2]。至 2022 年 10 月 30 日, 世卫组织报告了 77 264 例猴痘确诊病例和 36 例死亡病例, 涉及 109 个国家和地区^[3]。国内 2022 年 9 月 16 日报告了首例输入型猴痘病例^[4]。2023 年 6 月, 中国内地新增 106 例猴痘确诊病例^[5]。猴痘临床症状跟天花类似, 但有一些猴痘的独特特征, 例如在病程早期发热时发生淋巴结肿大^[6]。美国猴痘感染的主要临床特征包括淋巴结肿大、特异性皮疹、发热、寒战、头痛和肌痛等,

一般持续 2~4 周^[7]。猴痘病毒感染者死亡率为 0%~11%, 其中以儿童死亡率最高^[8]。猴痘从动物传播给人类的方式包括直接接触感染动物的患病部位或体液、被动物抓挠或咬伤、食用感染动物的肉等。猴痘的人际传播是与感染猴痘病毒的患者密切接触引起的,

* **【基金项目】** 国家自然科学基金(No. 81902170)。

** **【通讯作者】** 李恒, E-mail: Leehome1985@163.com

【作者简介】 张郁勃(1995-), 男, 河北石家庄人, 在读硕士研究生, 主要从事病原微生物的分子生物学研究。E-mail: 2390296797@qq.com

包括猴痘患者呼吸道分泌物、患者的床上用品和衣服、与感染猴痘患者面对面接触等^[9]。目前已报道了相关并发症,包括继发性细菌感染、支气管肺炎、脓毒症或脑炎。如感染晚期艾滋病病毒者等免疫功能低下者,容易重症病程^[10]。猴痘病毒来势汹汹,但目前没有对应的疫苗和特效药^[11],所以研究开发猴痘的特效药和疫苗是必要的。

猴痘病毒属于正痘病毒属,该种属包括骆驼痘病毒、天花病毒、牛痘病毒等^[12]。猴痘病毒是一种包膜双链 DNA 病毒,基因组大小约为 197 kb,被包裹在直径为 140 至 260 nm 的椭圆形、哑铃形核心中,形成病毒粒子。基因组两端均有闭合的发夹、反向末端重复序列^[13-14]。其中 A29L 是细胞内成熟病毒 (Intracellular mature virion, IMV) 表面包膜蛋白,在促进病毒与细胞融合方面发挥重要作用,是理想的药物靶点^[15]。通过开发相关的阻断药物可以抑制病毒融合细胞,起到治疗与降低病毒载量的作用,本研究分析 A29L 蛋白的结构和功能,为理想靶点药物和疫苗的开发提供一定的借鉴。

材料与方 法

1 A29L 蛋白氨基酸序列及其编码基因序列的获取

登录 NCBI 数据库获取 A29L 蛋白的氨基酸序列和核苷酸序列。

2 方 法

2.1 A29L 基因序列分析 通过 NCBI 的 ORF Finder 分析 A29L 基因的开放阅读框。

2.2 A29L 蛋白的基本理化性质及亲疏水性 通过 ProtParam 工具预测分析 A29L 蛋白的相对分子质量、理论等电点、不稳定系数等理化性质;通过 ProtScale 预测分析 A29L 蛋白的亲水性。

2.3 A29L 蛋白信号肽和跨膜区预测和磷酸化位点分析 过 TMHMM Server v. 2.0 预测分析 A29L 蛋白是否存在跨膜区;通过 SignalP 4.1 Server) 预测 A29L 是否存在蛋白信号肽;NetPhos 3.1 Server 分析 A29L 蛋白磷酸化位点。

2.4 A29L 蛋白的二、三级结构 利用 SOPMA 软件预测 A29L 蛋白的二级结构;SWISS MODEL 构建 A29L 蛋白三级结构。

2.5 A29L 蛋白的抗原表位 利用 ABCpred 预测 A29L 蛋白 B 细胞抗原表位,通过 SYFPEITHI 预测 A29L 蛋白 T 细胞抗原表位。

2.6 A29L 蛋白的同源性分析 利用 BLAST 进行 A29L 蛋白的同源蛋白分析。

结 果

1 猴痘 A29L 基因相关信息及序列分析

从 NCBI GenBank 数据库获取猴痘 A29L 基因序列,登录号 (NC_063383.1)。A29L 基因序列长 333 bp,位于猴痘全基因组的 137 718~138 050 位置。ORF Finder 显示 A29L 序列含有 2 个开放阅读框架 (图 1),其中最长的 ORF1 全长为 333 bp,编码 110 个氨基酸。

表 1 A29L 蛋白 B 细胞抗原表位预测
Table 1 Prediction of B-cell antigenic epitopes of A29L protein

排名 Rank	序列 Sequence	起始位置 Start position	得分 Score
1	VKAYGDDNEETLKQRL	36	0.84
1	PETKREAIVKAYGDDN	28	0.84
2	TKAAKNPETKREAIVK	22	0.78
2	DLAIPATEFFSTKAAK	11	0.78
3	ITNITTKFEQIEKCKK	58	0.77
4	FEQIEKCKRNDEVLF	65	0.74
5	LRAAMISLAKKIDVQT	89	0.71
6	CCKRNDEVLFLENHA	71	0.70
7	TLKQRLTNLEKKITNI	46	0.69
8	FLENHAETLRAAMIS	80	0.66
9	DGTLFPGDDDLAIPAT	2	0.61



图 1 A29L 基因开放阅读框架
Fig. 1 Open reading frame of A29L gene

2 A29L 蛋白的理化性质和亲水性

运用 ProtParam 预测猴痘 A29L 蛋白由 110 个氨基酸组成,包含 19 种氨基酸,其中包括谷氨酸 (10.9%)、赖氨酸 (10.9%)、苏氨酸 (10.0%)、丙氨酸 (9.1%),分子式为 C₅₄₉H₈₈₇N₁₅₃O₁₇₅S₄,包含 1 768 个原子,相对分子质量为 12.559 24×10³,理论等电点为 5.73。其中脂肪族氨基酸系数为 73.73,不稳定系数为 32.28,属于较稳定蛋白。使用 ProtScale 软件对 A29L 蛋白进行亲疏水性预测 (图 2),其中最大亲水性系数为 1.567,最小为 -2.589,平均亲水系数为 -0.750,为亲水性蛋白。

3 A29L 蛋白信号肽、跨膜区预测和磷酸化位点

SignalP 4.1 Server 软件预测显示 A29L 蛋白无信号肽 (图 3),使用 TMHMM-2.0 预测蛋无跨膜区 (图 4)。根据 NetPhos 3.1 软件预测,A29L 蛋白包含 10 个磷酸化位点,具有 2 个丝氨酸磷酸化位点、8 个苏氨酸磷酸化位点 (图 5)。

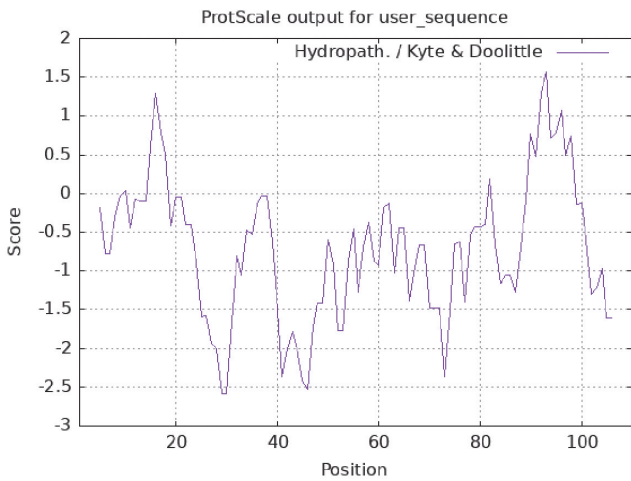


图 2 A29L 蛋白亲水性分析
Fig. 2 Hydrophilicity analysis of A29L protein

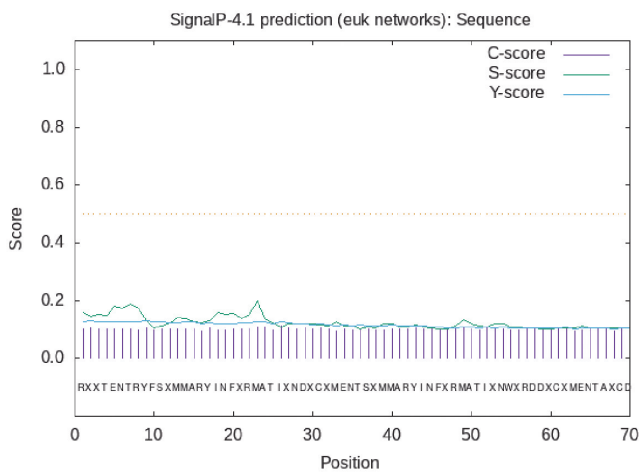


图 3 A29L 蛋白信号肽预测
Fig. 3 Signal peptide of A29L protein

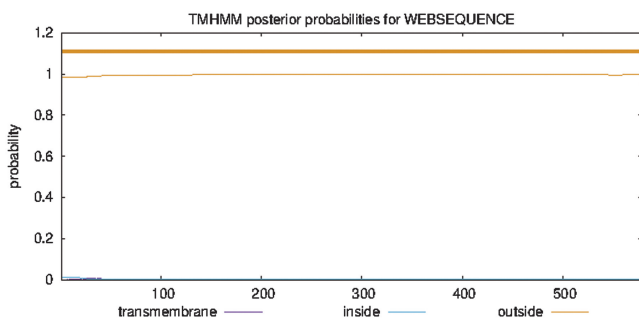


图 4 A29L 蛋白跨膜区预测
Fig. 4 Prediction of Transmembrane Regions of A29L protein

4 A29L 蛋白的二、三级结构

利用 SOPMA 预测 A29L 蛋白二级结构(图 6), 其中包含 63 个(57.27%) α -螺旋(Hh), 10 个(9.09%) 伸展链(Ee), 1 个(0.91%) β -转角(Tt), 36 个(32.73%)无规卷曲(Cc)。使用 SWISS MODEL 软件对 A29L 蛋白三级结构模型构建(图 7)。

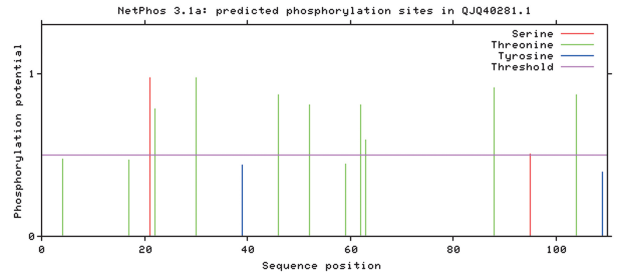


图 5 A29L 蛋白磷酸化位点预测
Fig. 5 Prediction of A29L protein phosphorylation sites

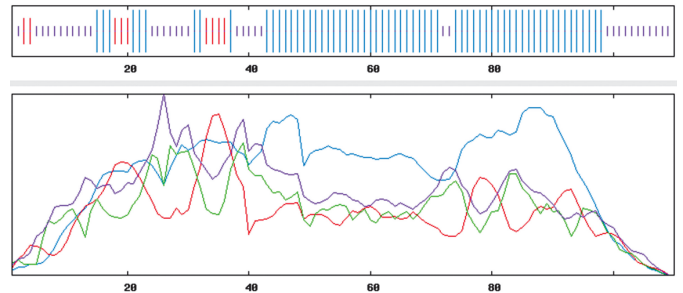


图 6 A29L 蛋白二级结构
Fig. 6 Secondary structure of A29L protein

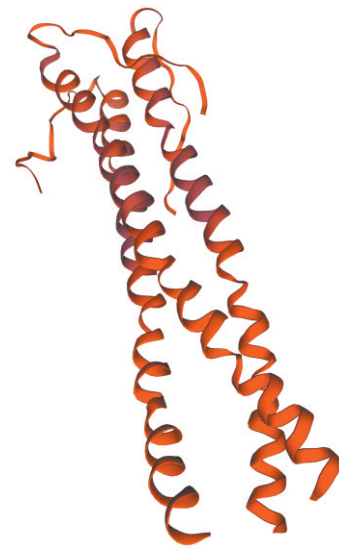


图 7 A29L 蛋白三级结构
Fig. 7 Tertiary structure of A29L protein

5 A29L 蛋白的抗原表位

利用 ABCpred 软件, 预测 A29L 蛋白含有 11 个 B 细胞抗原表位, 分数 > 0.5 (分数为 0-1)。利用 SYFPEITHI 软件预测有 6 个 CTL 细胞抗原表位, MHC 类型为 HLA-A * 02 : 01, 得分 ≥ 21 分(表 2); 10 个 Th 细胞表位, MHC 类型为 HLA-DRB1 * 0401, 得分 ≥ 20 分(表 3)。

表 2 A29L 蛋白 HLA-A * 02 : 01 限制性 CTL 抗原表位预测
Table 2 Prediction of HLA-A * 02 : 01 restricted CTL epitopes of A29L protein

排名 Rank	序列 Sequence	起始位置 Start position	得分 Score
1	TLFPGDDDL	4	25
2	TLKQRLTNL	46	23
3	NLEKKITNI	53	22
3	TLRAAMISL	88	22
3	AMISLAKKI	92	22
4	RLENHAETL	81	21

表 3 A29L 蛋白 HLA-DRB1 * 0401 Th 抗原表位预测
Table 3 Prediction of HLA-DRB1 * 0401 Th epitopes of A29L protein

排名 Rank	序列 Sequence	起始位置 Start position	得分 Score
1	EVLFRLNWHAETLRA	77	28
2	GTLFPGDDDLAIPAT	3	22
2	VKAYGDDNEETLKQR	36	22
2	TTKFEQIEKCKRND	62	22
3	REAIVKAYGDDNEET	32	20
3	KQRLTNLEKKITNIT	48	20
3	EKKITNITTKFEQIE	55	20
3	DEVLFRLNHAETLR	76	20
3	AETLRAAMISLAKKT	86	20
3	AAMISLAKKIDVQTG	91	20

6 A29L 同源蛋白分析

运用 BLAST 分析 A29L 蛋白的氨基酸序列,有 8 个同源性较高的蛋白。其中牛痘病毒 CPXV162 蛋白和牛痘病毒 A27L 蛋白与猴痘病毒的 A29L 同源性高。同源性分别是 95.45%和 94.55%(图 8)。

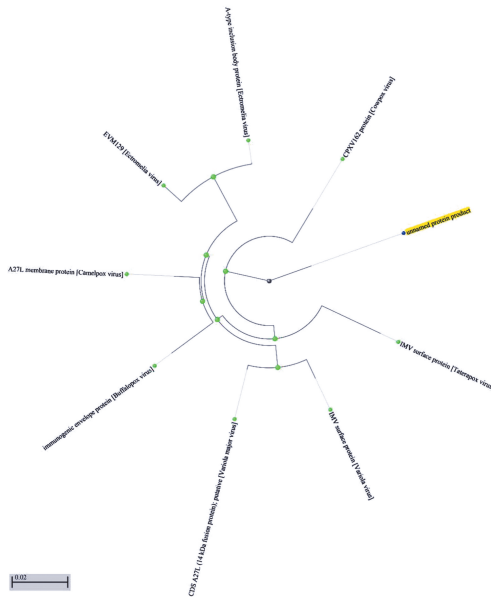


图 8 预测 A29L 蛋白同源性
Fig. 8 prediction of A29L protein homology

讨论

与其他需要在细胞核中复制的 DNA 病毒不同,猴痘病毒可以将自身复制所需的蛋白质在细胞质中表

达出来,所以能在细胞质中完整地复制循环^[13]。猴痘病毒复制过程中会产生两种具有传染性的病毒颗粒:细胞内成熟病毒 IMV 和细胞外包膜病毒 (Extracellular enveloped virion, EEV), IMV 在宿主细胞胞质中组装,形成单层膜;EEV 在高尔基体被加工成双层膜。IMV 通过细胞裂解后释放,主要介导不同宿主间传播^[16]。目前疫苗的研究主要集中在一些具有免疫原性的蛋白。如具有保护免疫原性的成熟病毒粒子表面蛋白 L1、A27、D8、H3 和囊膜病毒粒子的表面蛋白 B5 和 A33^[17]。A27 蛋白是三种糖胺聚糖 (Glycosaminoglycan, GAG) 粘附分子之一,与硫酸乙酰肝素特异性结合附着在细胞表面,对于胞内病毒进入宿主细胞起重要作用^[18]。因此该蛋白是病毒中和的靶标,已有研究表明猴痘病毒的 A29L 蛋白和牛痘病毒的 A27 蛋白与肝素结合的亲和力相似,且两种蛋白的同源性很高^[19],因此我们推测猴痘 A29L 蛋白可以作为中和抗体的关键靶点。正痘病毒通常每年仅有 1~2 个核苷酸位点突变,但目前的猴痘病毒已有 46 个位点变异,这极大增加了研发猴痘疫苗的难度^[20]。对比突变位点(表 4),A29L 基因不存在突变,这表明可以针对 A29L 开发广谱抗病毒阻断药与疫苗。

表 4 猴痘病毒突变位点
Table 4 Mutation sites of monkeypox virus

突变类型 Mutation type	突变 Mutations	突变位置 Mutation site
SNP	G→A	82460
SNP	C→T	84596
SNP	G→A	95043
SNP	G→A	124139
SNP	G→A	124683
SNP	C→T	128707
SNP	C→T	150480
SNP	A→C	151472
SNP	G→A	155806
SNP	C→T	162342
SNP	G→A	170273
SNP	G→A	178220

本研究利用生物信息学方法,以猴痘病毒的 A29L 蛋白为对象,对其结构和功能进行预测。利用 ProtParam、SignalP 4.1、TMHMM-2.0、NetPhos 3.1 Sever、SOPMA、SWISS-MODEL、ABCpred、SYFPEITHI、BLAST 等在线分析工具,分析猴痘病毒 A29L 蛋白的理化性质、信号肽、跨膜区、磷酸化位点、二三级结构、抗原表位、蛋白同源性等。结果显示, A29L 蛋白相对分子质量为 12.55924×10^3 ,等电点 7.89,是稳定亲水性蛋白。跨膜区软件显示该蛋白没有跨膜区段,且都在猴痘病毒膜外侧。SignalP 4.1 Server 软件显示 A29L 蛋白无信号肽,说明该蛋白并

非分泌蛋白。A29L蛋白有10个磷酸化修饰点,显示A29L蛋白可能受磷酸化调控。二级结构中有较多的 α -螺旋和无规则卷曲,显示出较好抗体嵌合性。ABCpred预测含有得分 >0.5 的B细胞表位11个,SYFPEITHI预测 ≥ 21 分以上的CTL细胞表位有6个, ≥ 20 的Th细胞表位有10个,可作为猴痘疫苗候选抗原。通过BLAST分析,A29L蛋白与牛痘病毒的A27蛋白同源性很高,表明A29L可以作为疫苗的候选蛋白。

当前猴痘病毒在全球肆虐,现有的疫苗和药物存在一定的不足,开发针对猴痘的疫苗和药物刻不容缓^[21-23]。A29L蛋白作为促进病毒包膜融合蛋白,在病毒与细胞融合过程中发挥重要的作用,但与其他包膜蛋白A35、H3L、E8L等蛋白的相互作用机制尚不清楚。本研究通过生物信息学分析A29L蛋白的性质和功能,为建立猴痘疫苗和治疗药物研发提供了理论基础。

【参考文献】

- [1] Reynolds MG, Guagliardo SAJ, Nakazawa YJ, et al. Understanding orthopoxvirus host range and evolution: from the enigmatic to the usual suspects [J]. *Curr Opin Virol*, 2018, 28: 108-115.
- [2] 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.
- [3] 姜婷婷, 陈祥生. 全球猴痘流行状况及趋势[J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2023, 39(7): 535-537.
- [4] Zhao H, Wang W, Zhao L, et al. The first imported case of monkeypox in the mainland of china-chongqing municipality, China, September 16, 2022 [J]. *China CDC weekly*, 2022, 4(38): 853-854.
- [5] http://www.chinacdc.cn/jkzt/crb/qt/szkb_13037/
- [6] Sklenovska N, Van Ranst M. Emergence of Monkeypox as the most important orthopoxvirus infection in humans [J]. *Front Public Health*, 2018, 6: 241.
- [7] Vaughan A, Aarons E, Astbury J, et al. Human-to-human transmission of Monkeypox virus, United Kingdom, October 2018 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2020, 26(4): 782-755.
- [8] Alakunle E, Moens U, Nchinda G, et al. Monkeypox virus in Nigeria: Infection biology, epidemiology, and evolution [J]. *Viruses*, 2020, 12(11): 890-895.
- [9] 马丽丽, 蒋涛, 赵晏强, 等. 全球猴痘病毒知识图谱和多维主题分析研究[J]. *病毒学报*, 2022, 38(5): 1069-1079.
- [10] Fischer F, Mehrl A, Kandulski M, et al. Monkeypox in a patient with controlled HIV infection initially presenting with fever, painful pharyngitis, and tonsillitis [J]. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 2022, 58(10): 1409.
- [11] Rizk JG, Lippi G, Henry BM, et al. Prevention and treatment of Monkeypox [J]. *Drugs*, 2022, 82(9): 957-963.
- [12] Smith SA, Kotwal GJ. Immune response to poxvirus infections in various animals [J]. *Critical Rev Microbiol*, 2002, 28(3): 149-185.
- [13] Kabuga AI, EL Zowalaty ME. A review of the monkeypox virus and a recent outbreak of skin rash disease in Nigeria [J]. *J Med Virol*, 2019, 91(4): 533-540.
- [14] Saxena SK, Ansari S, Maurya VK, et al. Re-emerging human monkeypox: A major public-health debacle [J]. *J Med Virol*, 2022: e27902.
- [15] Roumillat LF, Patton JL, Davis ML. Monoclonal antibodies to a monkeypox virus polypeptide determinant [J]. *J Virol*, 1984, 52(1): 290-292.
- [16] Kumar N, Acharya A, Gendelman HE, et al. The 2022 outbreak and the pathobiology of the monkeypox virus [J]. *J Autoimmun*, 2022, 131: 102855.
- [17] 吕诗韵, 卢佳, 李新国, 等. 猴痘病毒及其疫苗的研究进展[J]. *中国生物制品学杂志*, 2022, 35(12): 1409-1413.
- [18] Kaefer T, Matho MH, Meng X, et al. Linear epitopes in vaccinia virus A27 are targets of protective antibodies induced by vaccination against smallpox [J]. *J Virol*, 2016, 90(9): 4334-4345.
- [19] Hughes LJ, Goldstein J, Pohl J, et al. A highly specific monoclonal antibody against monkeypox virus detects the heparin binding domain of A27 [J]. *Virology*, 2014, 464-465: 264-273.
- [20] 苏琳佳, 许方婧伟, 张云涛. 猴痘病毒疫苗的研究进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 2022, 50(5): 1-5.
- [21] 王毅豪, 刘承锐, 刘昊霖, 等. 猴痘 F3L 蛋白的表达、纯化及多克隆抗体制备[J]. *中国病原生物学杂志*, 2023, 18(11): 1274-1278.
- [22] 王道, 刘文彬, 宋甜. 猴痘病毒相关蛋白 A42R 的生物信息学及分子对接分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2024, 19(1): 1-9.
- [23] Bhattacharya M, Dhama K, Chakraborty C. A call for a novel and next-generation vaccine against monkeypox disease [J]. *An Med Surgery*, 2012, 84: 104968.

【收稿日期】 2023-10-16 【修回日期】 2024-01-02