

doi:10.3969/j.issn.1000-484X.2023.06.027

· 论著/基础免疫学 ·

新冠病毒受体蛋白 ACE2 结构与功能的生信分析及原核表达^①徐本锦 陈晓聪^{②③} 宣焱^② 杜森 范蕾^③ 李卓禧^③ 李璟^③ 刘玲^④ 宋彬好^⑤ 侯艳香
(山西医科大学汾阳学院医学检验系, 汾阳 032200)

中图分类号 Q812 R392 文献标志码 A 文章编号 1000-484X(2023)06-1230-08

[摘要] 目的:构建 ACE2 原核表达载体并对其进行结构与功能的生物信息学分析,探究其介导 SARS-CoV-2 入侵人体的分子机制。方法:采用 ProtParam、ProtScale、NetPhos3.1、SignalP 4.1、YinOYang 1.2 Server、NetNGlyc 1.0 Server、SOPMA、SWISS-MODEL、Blast、Clustal X2 和 MEGA7.0 等对 ACE2 的生物学特性、同源性及进化性进行系统分析。采用分子克隆技术构建 pET-22b-ACE2,在大肠杆菌中进行表达。结果:ACE2 全长 805 个残基,呈酸性,分子量为 92.5 kD, pI=5.36, 共含 77 个潜在的磷酸化位点和 14 个糖基化位点,是一种亲水性较强的跨膜蛋白。ACE2 主要分布于内质网膜、高尔基体和胞质膜,二级结构组成以 α -螺旋为主。原核表达结果显示,细菌裂解后,沉淀中 ACE2 表达多于上清与全菌,为疫苗研发提供了理论依据。多序列比对和进化分析显示,倭黑猩猩与智人亲缘关系最近。结论:本研究为 ACE2 蛋白的纯化及研究奠定了基础,有助于阐明 ACE2 介导 SARS-CoV-2 入侵人体的分子机制,对 SARS-CoV-2 感染治疗和跨物种传播提供了新的见解,为研究广谱抗病毒药物、治疗 SARS-CoV-2 和其他致命冠状病毒株的有效分子靶点提供了依据。

[关键词] SARS-CoV-2;载体构建;ACE2 蛋白;生信分析;原核表达

Bioinformatics analysis on structure and function of SARS-CoV-2 receptor protein ACE2 and its prokaryotic expression

XU Benjin, CHEN Xiacong, XUAN Yan, DU Miao, FAN Lei, LI Zhuoxi, LI Jing, LIU Ling, SONG Binyu, HOU Yanxiang. Department of Medical Laboratory, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China

[Abstract] **Objective:** To construct prokaryotic expression vector of ACE2, to analyze its structure and function by bioinformatics and to explore molecular mechanism of SARS-CoV-2 invasion into human body. **Methods:** Biological characteristics, homology and evolution were systematically analyzed by ProtParam, ProtScale, NetPhos3.1, SignalP 4.1, YinOYang 1.2 Server, NetNGlyc 1.0 Server, SOPMA, SWISS-MODEL, Blast, Clustal X2 and MEGA7.0. pET-22b-ACE2 was constructed by molecular cloning technology and expressed in *E. coli*. **Results:** ACE2 was an acidic transmembrane protein with 805 amino acids, whose molecular weight was 92.5 kD, pI=5.36, had 77 potential phosphorylation sites and 14 glycosylation sites. ACE2 was mainly distributed in endoplasmic reticulum, golgi apparatus and cell membrane of host cells, whose secondary structure was mainly composed of α -helix. Prokaryotic expression results showed that ACE2 was mainly expressed in precipitation after centrifugation of bacterial lysate, which laid a foundation for vaccine development. Multiple sequence alignment and evolutionary analysis showed that Pan paniscus had closest genetic relationship with Homo sapiens. **Conclusion:** This study provides a basis for purification and research of ACE2 protein, and helps to clarify molecular mechanism of ACE2 mediated SARS-CoV-2 invasion into human body, provides new insights into treatment and cross spe-

①本文受山西省高等学校科技创新项目(2020L0749);山西医科大学汾阳学院引进人才启动金项目(2020A01);国家级大学生创新创业训练计划项目(202117114001);山西省高等学校大学生创新创业训练计划重点项目(S202117114008);山西省高等学校大学生创新创业训练计划重点项目(20221577);山西省基础研究计划(自由探索类)项目(20210302123397, 202203021212351);吕梁市科技计划项目(2020SHFZ29)资助。

②共同第一作者。

③山西医科大学汾阳学院基础医学部,汾阳 032200。

④通信作者, E-mail: llily_BJ123@sohu.com。

⑤山西医科大学汾阳学院科技中心,汾阳 032200。

作者简介:徐本锦,男,博士,副教授,硕士生导师,主要从事病原分子生物学方面的研究, E-mail:bj0726@sxmu.edu.cn。

cies transmission of SARS-CoV-2 infection, and provides a basis for study of broad-spectrum antiviral drugs and effective molecular targets for treatment of SARS-CoV-2 and other deadly coronavirus strains.

[Key words] SARS-CoV-2; Vector construction; ACE2 protein; Bioinformatics analysis; Prokaryotic expression

冠状病毒近二十年共导致3次大暴发,新冠病毒 SARS-CoV-2较2003年的严重急性呼吸综合征冠状病毒 SARS-CoV和2012年的中东呼吸综合征冠状病毒 MERS-CoV传染性、隐蔽性更高,具有广泛组织趋向性等特征^[1]。冠状病毒是一个高度多样化的单股正链 RNA 病毒家族, SARS-CoV-2属于 β 冠状病毒^[2-3]。在基因组水平上, SARS-CoV-2与 SARS-CoV序列有79.6%相同,与蝙蝠冠状病毒序列有96%相同^[4]。

编码人类血管紧张素转化酶2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)的基因位于X染色体, ACE2为I型跨膜糖蛋白,含有N端信号肽、C端结构域和有催化活性的胞外结构域^[5]。ACE2是SARS-CoV-2受体, SARS-CoV-2 S蛋白受体结合结构域(receptor binding domain, RBD)可与人体细胞表面的ACE2相互作用引起感染^[6]。因此, ACE2对SARS-CoV-2预防、诊断和治疗具有重要意义。

研究发现, SARS-CoV和MERS-CoV分别通过果子狸和单峰骆驼直接传播给人类,且这两种病毒被认为起源于蝙蝠^[7]。水貂突变株研究表明 SARS-CoV-2可在其他动物宿主中复制并传播,因此新冠病毒具有通过其他动物扩大传播的风险^[8]。SARS-CoV-2的宿主范围及中间宿主仍不明确,对受体ACE2作用机制的认识仍有限。本研究对不同物种ACE2蛋白进行同源性及进化性分析,以期确定新冠病毒宿主范围提供参考。对ACE2的研究有助于阐明其作为受体介导病毒入侵的分子机制,为SARS-CoV-2感染治疗提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料 ACE2氨基酸序列由NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载,检索号为BAB40370.1; pET-22b载体为本实验室保存, *Nde* I和*Xho* I购自NEB; DNA marker购自大连宝生物; Protein Ruler II、胶回收试剂盒、质粒抽提和*E. coli*感受态细胞(Top10和BL21)购自北京全式金; 氨苄西林、IPTG购自国药集团; NaCl购自天津欧博凯化工有限公司。

1.2 方法

1.2.1 ACE2蛋白理化性质分析 利用在线分析软件 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)对ACE2的理化性质进行分析。

1.2.2 ACE2蛋白亲/疏水性及跨膜区分析 利用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>)分析ACE2蛋白的亲水性和疏水性; 利用TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)分析ACE2蛋白的跨膜区。

1.2.3 ACE2蛋白卷曲螺旋、磷酸化位点及亚细胞定位分析 利用在线服务器(https://embnet.vitalit.ch/software/COILS_form.html)对ACE2进行卷曲螺旋分析; 利用NetPhos3.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)在线工具预测ACE2蛋白磷酸化位点; 利用PSORT II Prediction (<https://psort.hgc.jp/form2.html>)预测ACE2的亚细胞定位。

1.2.4 ACE2蛋白信号肽及糖基化位点预测 利用SignalP 4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)判断是否存在信号肽; 利用YinOYang 1.2 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>)分析其O-糖基化位点; 利用NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)分析其N-糖基化位点。

1.2.5 ACE2蛋白相互作用分析 通过UniProt网站 Interaction (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9BYF1>)和STRING (<https://string-db.org/network/9606.ENSP00000389326>)数据库进行二元互作分析和蛋白互作网络分析。

1.2.6 ACE2蛋白二/三级结构分析 利用SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)分析ACE2蛋白二级结构; 利用SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)和UniProt网站分析其三级结构。

1.2.7 ACE2蛋白进化与同源性分析 利用UniProt(<https://www.uniprot.org/>)的blast功能搜索与人源ACE2序列相似性较高的17种动物源ACE2, 利用ClustalX2软件对这18个物种的ACE2蛋白进行多序列比对和同源性分析。利用MEGA7.0经1500次置信度构建系统进化树, 分析人源ACE2蛋白与其他物种的进化关系。

1.2.8 表达载体pET-22b-ACE2构建 对空载体pET-22b和ACE2基因片段同时进行*Xho* I和*Nde* I双酶切, 回收酶切片段, 将目的片段与载体连接后转化Top10感受态细胞, 进行菌落PCR验证, 将重组质粒转化BL21, 进行蛋白诱导表达。

1.2.9 ACE2 蛋白诱导表达 37 °C、220 r/min 培养 7 h,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导,30 °C、220 r/min 继续培养 12 h,采用 10%SDS-PAGE 检测目的蛋白表达。

2 结果

2.1 ACE2 蛋白理化性质分析 人源 ACE2 蛋白由 805 个氨基酸组成,各氨基酸含量见表 1。负电荷氨基酸(Asp+Glu)99 个,其中 Asp 43 个,Glu 56 个;正电荷氨基酸(Arg+Lys+His)94 个,其中 Lys 46 个,Arg 32 个,His 16 个。含量最高的为 Leu(9.4%),其次为 Glu(7.0%)。分子式为 C₄₁₇₀H₆₃₅₈N₁₀₉₄O₁₂₂₂S₃₅,原子总数为 12 879,分子量为 92.5 kD,理论等电点 5.36,偏酸性,消光系数为 176 170 mol/(L·cm),哺乳动物网织红细胞中的半衰期为 30 h,不稳定系数为 40.10,脂溶系数为 80.55,平均亲水系数为 -0.376。

2.2 ACE2 蛋白亲/疏水性分析 ACE2 蛋白平均亲水系数为 -0.376,残基 K771 亲水性最强,Score 值为 -3.311;I757 疏水性最强,Score 值为 3.778;亲水氨基酸数量比疏水氨基酸多。因此,ACE2 为亲水性蛋白(图 1)。

表 1 人源 ACE2 蛋白的氨基酸组成

Tab. 1 Amino acid composition of human ACE2 protein

Amino acids	n	Frequency/%	Amino acids	n	Frequency/%
Ala(A)	51	6.3	Leu(L)	76	9.4
Arg(R)	32	4.0	Lys(K)	46	5.7
Asn(N)	54	6.7	Met(M)	27	3.4
Asp(D)	43	5.3	Phe(F)	39	4.8
Cys(C)	8	1.0	Pro(P)	37	4.6
Gln(Q)	38	4.7	Ser(S)	54	6.7
Glu(E)	56	7.0	Thr(T)	39	4.8
Gly(G)	43	5.3	Trp(W)	23	2.9
His(H)	16	2.0	Tyr(Y)	33	4.1

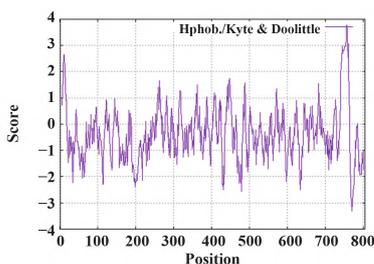


图 1 ACE2 蛋白亲水/疏水性分析
Fig. 1 Hydrophilic/hydrophobic analysis of ACE2 protein

2.3 ACE2 蛋白跨膜区预测 TMHMM 预测结果显示,ACE2 蛋白 M1-S740 位氨基酸在细胞膜外,S740-L760 位氨基酸序列处于跨膜区,I761-F805 位氨基酸在细胞内,约 92% 的结构在细胞膜外(图 2)。因此 ACE2 蛋白具有跨膜螺旋区,是一种跨膜蛋白。

2.4 ACE2 蛋白卷曲螺旋分析 卷曲螺旋(coiled coil)分析显示,3 种不同窗口宽度(14、21、28)检测到 1 个卷曲螺旋结构(score>0.1),位于 N90~N103 残基之间(图 3)。

2.5 ACE2 蛋白磷酸化位点预测 磷酸化位点预测结果显示,ACE2 蛋白共有 77 个磷酸化位点(图 4),其中 38 个丝氨酸(Ser)磷酸化位点,22 个苏氨酸(Thr)磷酸化位点,17 个酪氨酸(Tyr)磷酸化位点。所有磷酸化位点及对应激酶见表 2。

2.6 ACE2 蛋白亚细胞定位分析和信号肽预测 亚细胞定位分析显示,人源 ACE2 蛋白主要存在于内质网膜(44.4%)、细胞质膜(22.2%)和高尔基体(33.3%)。通过预测 N 端前 70 个序列中是否含有潜在酶切位点判断 ACE2 蛋白是否含有信号肽,结

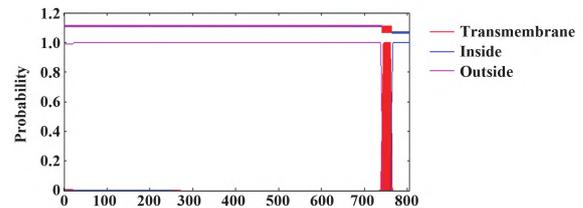


图 2 人源 ACE2 蛋白跨膜结构预测
Fig. 2 Transmembrane structure prediction of human ACE2 protein

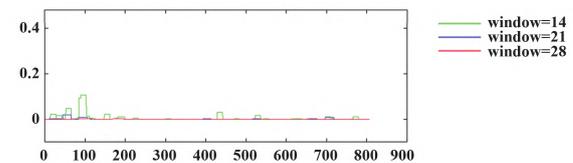


图 3 人源 ACE2 蛋白卷曲螺旋分析
Fig. 3 Coiled coil analysis of human ACE2 protein

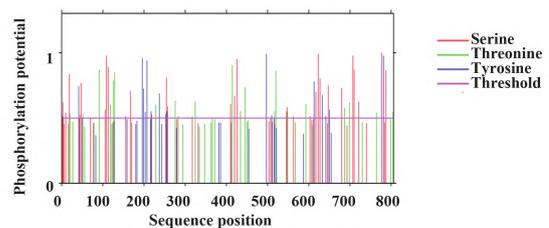


图 4 人源 ACE2 蛋白磷酸化位点预测
Fig. 4 Prediction of phosphorylation sites of human ACE2 protein

果显示,ACE2的S19-T20间存在酶切位点(AQS-TI, 概率:0.343 2),具有信号肽的概率为0.984 6,远高于阈值0.5,说明该蛋白具有信号肽,是分泌型蛋白(图5)。

表2 人源ACE2蛋白磷酸化位点及对应激酶
Tab.2 Phosphorylation sites and corresponding kinases of human ACE2 protein

Site	Score	Kinase	Site	Score	Kinase	Site	Score	Kinase
S2	0.511	cdc2	Y207	0.935	unsp	S545	0.547	PKA
S3	0.614	PKA	Y217	0.548	INSR	S547	0.577	unsp
S4	0.507	PKA	S218	0.521	CK I	T548	0.543	PKC
S10	0.537	cdc2	T229	0.596	CK II	S563	0.506	cdc2
S19	0.833	unsp	Y237	0.685	unsp	T593	0.602	PKC
T20	0.531	CK II	Y252	0.528	INSR	S602	0.510	cdc2
Y41	0.736	unsp	S254	0.807	unsp	Y613	0.777	unsp
S43	0.501	CK II	Y255	0.549	unsp	S617	0.698	PKC
S44	0.522	DNAPK	S257	0.586	cdk5	S623	0.997	unsp
S47	0.764	PKC	T276	0.627	PKA	S626	0.804	unsp
T52	0.530	CK II	T282	0.510	PKC	Y633	0.672	unsp
S70	0.501	cdc2	T294	0.444	CK II	Y641	0.513	unsp
T92	0.863	PKC	S317	0.503	PKA	S646	0.748	PKA
S105	0.515	cdc2	T324	0.622	DNAPK	Y649	0.563	unsp
S106	0.563	cdc2	S409	0.602	DNAPK	S680	0.728	PKA
S109	0.974	unsp	T414	0.898	unsp	T686	0.572	PKC
S113	0.887	unsp	S420	0.665	PKA	S707	0.971	unsp
T118	0.599	unsp	S425	0.951	unsp	S709	0.869	unsp
T125	0.781	unsp	T434	0.551	CK II	S721	0.622	unsp
S128	0.731	PKC	T445	0.731	unsp	T763	0.534	PKC
T129	0.842	PKC	T496	0.713	unsp	S776	0.997	unsp
S155	0.514	cdc2	Y497	0.984	unsp	Y781	0.973	unsp
S167	0.702	PKC	Y510	0.515	unsp	S787	0.864	unsp
Y196	0.957	unsp	Y515	0.501	INSR	T803	0.542	unsp
Y199	0.719	unsp	T517	0.546	PKG	S804	S507	CK I
Y202	0.545	unsp	T519	0.853	PKC	-	-	-

Note: Unsp indicates an undetermined kinase.

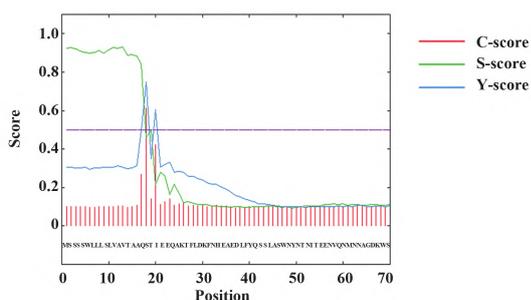


图5 人源ACE2蛋白信号肽预测
Fig.5 Prediction of signal peptide of human ACE2 protein

2.7 ACE2蛋白的糖基化位点预测

2.7.1 O-糖基化位点预测 结果显示,ACE2蛋白共有8个O-糖基化位点,分别为S3、T15、S105、T294、S507、S740、T803和S804(图6)。

2.7.2 N-糖基化位点预测 结果显示,ACE2蛋白共有6个N-糖基化位点,分别为N53、N90、N103、N322、N432和N690(图7)。

2.8 ACE2蛋白二元互作分析 二元互作分析显示,人源ACE2蛋白与12个人源或病毒蛋白存在二元互作,分别为其本身(ACE2)、SARS-CoV 刺突蛋白(SPIKE)、跨膜丝氨酸蛋白酶(TMPS2)、SARS-CoV-2 刺突蛋白(SPIKE)、人冠状病毒 NL63(HCoV-NL63) 刺突蛋白(SPIKE)、中性氨基酸转运蛋白(S6A19)、激肽原-1(KNG1)、血管紧张素原(ANGT)、防御素5(DEF5)、SARS冠状病毒PC4-145刺突蛋白(SPIKE)、整合素β1亚单位抗体(ITB1)及神经降压肽(NEUT, 图8)。

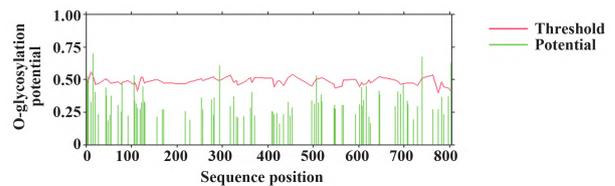


图6 人源ACE2蛋白O-糖基化位点预测
Fig.6 Prediction of O-glycosylation sites of human ACE2 protein

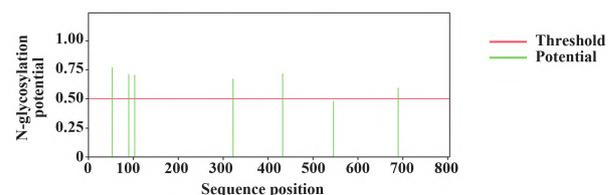


图7 人源ACE2蛋白N-糖基化位点预测
Fig.7 Prediction of N-glycosylation sites of human ACE2 protein

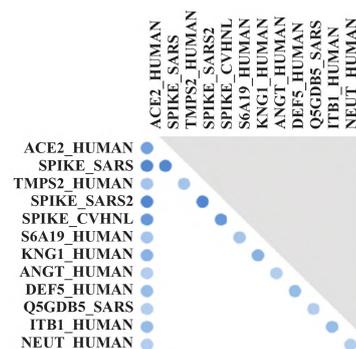


图8 人源ACE2蛋白二元互作分析
Fig.8 Binary interaction analysis of human ACE2 protein

2.9 ACE2 蛋白互作网络 蛋白互作网络分析显示,ACE2 与 11 个蛋白存在相互作用,分别为其本身(ACE2)、1 型血管紧张素 II 受体(AGTR1)、2 型血管紧张素 II 受体(AGTR2)、血管紧张素原(AGT)、血管紧张素原酶(REN)、二肽基肽酶 4(DPP4)、Mepirin A α 亚单位(MEP1A)、Mepirin A β 亚单位(MEP1B)、溶酶体 Pro-X 羧肽酶(PKCP)、脑啡肽酶(MME)和 Xaa-氨基肽酶原 2(图 9)。

2.10 ACE2 蛋白二级结构分析 二级结构分析显示,ACE2 蛋白含有 α -螺旋(Hh) 431 个,占比 51.30%,已知 α -螺旋是一种稳定的二级结构,推测

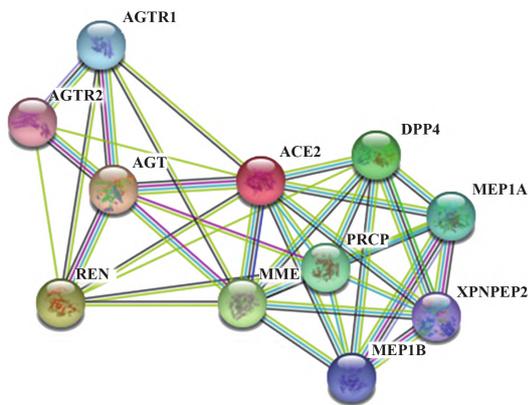


图 9 人源 ACE2 蛋白互作网络
Fig. 9 Protein-protein interaction network of human ACE2

ACE2 蛋白结构稳定;此外,含有 β 转角(Tt)31 个,占比 3.85%;延长链(Ee)90 个,占比 11.18%;无规则卷曲(Cc)271 个,占比 32.66%(附图 1, www.immune99.com)。

2.11 突变对 ACE2 蛋白功能的影响 检索数据库发现,目前已有多个入源 ACE2 蛋白突变位点被报道(表 3),这些位点突变对 ACE2 的酶切活性及其对刺突蛋白的亲合力造成了不同程度影响。

2.12 ACE2 蛋白三级结构分析 ACE2 含有 N 端信号肽、C 端结构域和有催化活性的胞外结构域,胞外区域由两个结构域组成,第一个为锌-金属肽酶结构域(S19-S611),第二个结构域位于 C 端(P612-S740)。将 ACE2 蛋白在 Swiss-Model 数据库中与已有蛋白序列进行比对建模,预测 ACE2 蛋白三级结构(图 10)。

2.13 ACE2 蛋白同源性分析 本研究选取与智人序列相似度较高的 17 个物种 ACE2 蛋白序列(分别为中华鳖、鬃狮蜥、家鸡、倭黑猩猩、川金丝猴、家鼠、穴兔、绵羊、牛、白尾鹿得克萨斯亚种、抹香鲸、欧亚野猪、家猫、狗、马铁菊头蝠、西欧刺猬及安水金线鲃)进行比对,结果显示,与人源 ACE2 蛋白序列一致性最高的是倭黑猩猩(98.9%),其次为川金丝猴(95.0%),再次是家猫和穴兔(均为 85.2%);人与家鸡、鬃狮蜥、中华鳖的序列一致性分别为

表 3 人源 ACE2 蛋白的突变位点

Tab. 3 Mutation sites of human ACE2 protein

Mutation sites	Impacts on functionality
S19P, Q24T, A25V, T27Y, L29F, K31Y, N33D, H34A, L39R, F40D, Q42L, W69V, F72Y, E75K, Q76T, L79T, Q89P, N90Q, L91P, T92Q, T324P, Q325P, N330Y, L351F, A386L, P389D, R393K, R518G	Slightly increase interaction between ACE2 and RBD domain of SARS-CoV-2 spike protein ^[9]
QAK24-26KAE, K68D, M383A, P389A, R393A, SPD425-427PSN, R559S K31D, K353H/A/D	Slightly inhibit interaction between ACE2 and SARS-CoV spike protein ^[10] Cause ACE2 to lose its ability to interact with SARS-CoV spike protein ^[10]
E37A, D38A, E110P, PD135-136SM, E160R, R192D, R219D, H239Q, K309D, E312A, T324A, NVQ338-340DDR, D350A, L359K/A, KGE465-467QDK, F603T	Does not affect interaction between ACE2 and SARS-CoV spike protein ^[10]
Y41A, D355A, R357A	Strongly inhibit interaction between ACE2 and SARS-CoV spike protein ^[10]
MYP82-84NFS	Inhibits interaction between ACE2 and SARS-CoV spike protein ^[10]
R273Q, H345A, H505A	All activity of enzyme lost ^[11-12]
R169Q, W271Q	ACE2 loses approximately 95% of enzyme cleavage activity of angiotensin I ^[13]
K481Q	ACE2 loses approximately 80% of enzyme cleavage activity of angiotensin I ^[13]
R514Q	ACE2 loses approximately 50% of enzyme cleavage activity of angiotensin I, but enzyme cleavage activity of angiotensin II increases twofold ^[13]

66.2%、64.4%、66.9%，与安水金线鲃的一致性最低，为58.4%，*代表相同的氨基酸(277个，34.4%)；:代表性质接近的氨基酸(91个，11.3%)；.代表性质差异较大的氨基酸(69个，8.6%)，见附图2(www.immune99.com)。

2.14 ACE2蛋白的系统进化分析 采用MEGA7.0对18个物种的ACE2蛋白进行进化分析，结果显示，倭黑猩猩与智人的亲缘关系最近，其次为川金丝猴，三者聚为一支，置信度为100。绵羊、牛及白尾鹿得克萨斯亚种聚为一支，置信度为100，提示其亲缘关系较近。家猫、狗聚为一支，置信度为99，但与人的距离较远。中华鳖、鬃狮蜥、家鸡、安水金线鲃及西欧刺猬单独聚为一大支，置信度为100(图11)。

2.15 pET-22b-ACE2原核表达载体构建

2.15.1 ACE2基因片段酶切和菌落PCR验证 对人源ACE2基因片段进行*Nde*I、*Xho*I和*Apal*I的三酶切(图12A)。通过菌落PCR扩增ACE2蛋白编码序列，1.8%琼脂糖凝胶电泳检测(图12B)，结果显示片段大小符合预期。

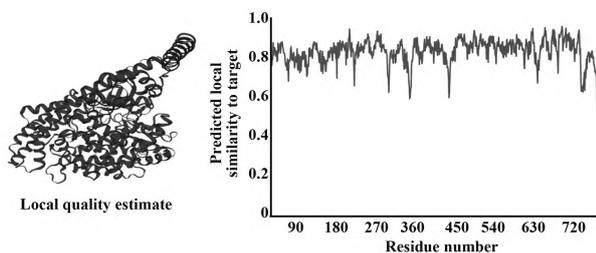
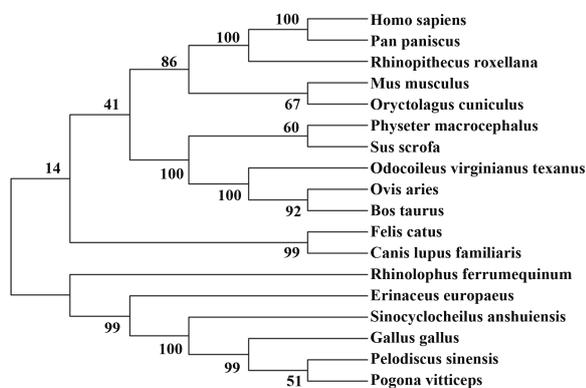


图10 ACE2蛋白三级结构预测及其同源蛋白相似性波形图
Fig.10 Tertiary structure prediction of ACE2 protein and similarity waveform of its homologous proteins

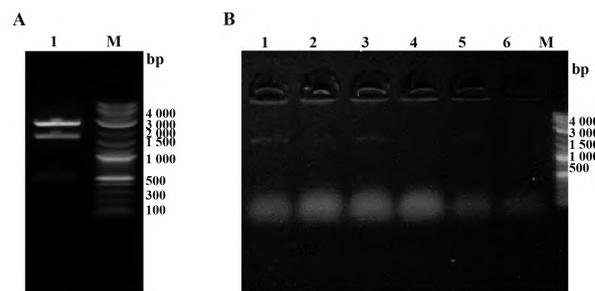


Note: Entry numbers are same as affiliated Fig. 2.

图11 基于ACE2氨基酸序列构建的智人与动物系统进化树
Fig.11 Phylogenetic tree of Homo sapiens and animals based on ACE2 amino acid sequence

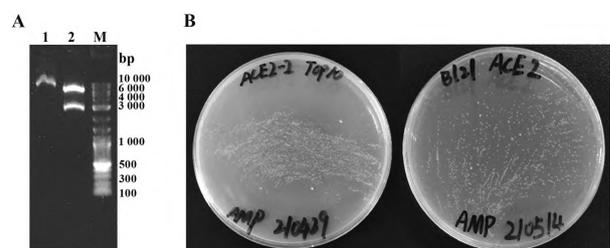
2.15.2 重组质粒 pET-22b-ACE2 酶切验证与转化 将重组质粒用*Nde*I和*Xho*I双酶切，1.8%琼脂糖凝胶电泳检测(图13A)，结果显示大小符合预期。将重组质粒转化大肠埃希菌 Top10感受态细胞，涂布氨苄抗性的LB平板，37℃培养12h，(图13B左)。挑取单克隆后抽提质粒，转化BL21感受态细胞，为蛋白表达做准备(图13B右)。

2.16 ACE2蛋白诱导表达检测 如图14所示，挑取两个BL21单克隆(红色框和黄色框)，IPTG诱导后10%SDS-PAGE检测，结果显示：与诱导前相比，诱导后ACE2表达明显升高(4泳道高于1泳道，10泳道高于7泳道)。为优化ACE2蛋白纯化条件，本研究分别检测诱导前后全菌、上清和沉淀中ACE2蛋白表达，结果显示，ACE2主要在沉淀中表达(3和6泳道，9和12泳道)，因此在进行蛋白纯化时优先考虑从沉淀中纯化。



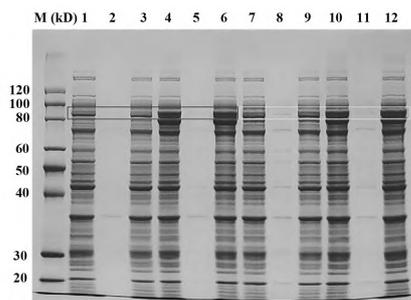
Note: A. Electrophoretic detection of three enzyme digestion products of ACE2 gene fragment; 1. *Nde*I, *Xho*I and *Apal*I digestion products of ACE2 gene fragment; M. 2-log DNA marker; B. Colony PCR validation; 1-6. Colony PCR amplification products, lanes 1, 3 and 5 were positive clones.

图12 ACE2基因片段酶切及菌落PCR验证
Fig.12 Enzyme digestion of ACE2 gene fragment and colony PCR verification



Note: A. Verification of pET-22b-ACE2 by *Nde*I and *Xho*I digestion; 1. No digestion; 2. *Nde*I and *Xho*I digestion; M. 2-log DNA marker; B. pET-22b-ACE2 plasmid was transformed into competent cells, Top10 on left and BL21 on right.

图13 重组质粒 pET-22b-ACE2 酶切验证与转化
Fig.13 Enzyme digestion verification and transformation of recombinant plasmid pET-22b-ACE2



Note: M. Protein marker; 1-3. Whole cell lysate, centrifugation supernatant and centrifugation precipitation before IPTG induction; 4-6. Whole cell lysate, centrifugation supernatant and centrifugation precipitation after IPTG induction; 7-9. Whole cell lysate, centrifugation supernatant and centrifugation precipitation before IPTG induction; 10-12. Whole cell lysate, centrifugation supernatant and centrifugation precipitation after IPTG induction.

图 14 人源 ACE2 蛋白诱导表达检测

Fig. 14 Detection of induced expression of human ACE2 protein

3 讨论

ACE2 蛋白是 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 入侵人体细胞的共同受体,是新冠肺炎疫苗研制的关键靶点和药物作用靶标^[14]。SARS-CoV-2 大流行使 ACE2 成为研究人员普遍关注的焦点。

本研究显示,ACE2 由 805 个氨基酸组成,分子量为 92.5 kD,等电点为 5.36,亲水性较强,具有信号肽,是一种分泌型蛋白。跨膜区分析显示,ACE2 是一种跨膜蛋白,且该蛋白 92% 的结构位于细胞膜外;二级结构分析发现,无规则卷曲在 ACE2 蛋白中占比 32.66%,多种跨膜蛋白的跨膜区常含有这种结构。以上特征与 ACE2 作为病毒受体蛋白的功能吻合。

糖基化和磷酸化是两种重要的翻译后修饰形式,糖基化对 ACE2 与病毒结合至关重要^[15]。本研究显示,ACE2 蛋白有 14 个潜在糖基化位点,其中 6 个 N-糖基化位点(N53、N90、N103、N322、N432 和 N690)已被证实,且 N90 糖基化修饰可能限制 SARS 的传染性^[16-19]。磷酸化修饰主要参与细胞信号传导,对蛋白活性和功能具有重要影响,ACE2 蛋白有 77 个可能的磷酸化位点,其中丝氨酸磷酸化位点 38 个,苏氨酸磷酸化位点 22 个,酪氨酸磷酸化位点 17 个。

多序列比对结果显示,ACE2 蛋白在进化上高度保守。在选取的 18 条序列中,智人与蝙蝠及陆生、海洋哺乳动物 ACE2 蛋白均有较高的序列一致性,为 LIU 等^[20]报道的“SARS-CoV-2 可能感染广泛

哺乳动物宿主”提供了依据。本研究还对智人与家猫、狗、欧亚野猪、红原鸡及白尾鹿得克萨斯亚种的 ACE2 序列一致性进行了分析。ELISA 实验发现,疫情暴发后收集的 102 份猫血清中有 15 份(14.7%)对 SARS-CoV-2 受体结合域(RBD)呈阳性^[21]。调查与人类密切接触的动物和雪貂对 SARS-CoV-2 的易感性发现:SARS-CoV-2 在雪貂和猫中复制效率较高,而在猪、狗、鸡、鸭中的复制能力较弱^[22]。且猫易受到空气传播感染。白尾鹿(*Odocoileus virginianus*)的 ACE2 与人类高度相似,PALMER 等^[23]发现白尾鹿易感 SARS-CoV-2,且感染的白尾鹿能将病毒传播给健康鹿,证明白尾鹿是对 SARS-CoV-2 敏感的野生动物。系统进化分析显示,智人与倭黑猩猩最先聚为一支,置信度为 100,说明二者亲缘关系最近,暗示倭黑猩猩可能是新冠病毒的潜在宿主。

SARS-CoV-2 的致病机制尚不清楚,ACE2 作为 SARS-CoV 与 SARS-CoV-2 入侵人体细胞的共同受体,且患者临床表现均以肺损伤为主,推测 SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 的致病机制相似^[18]。SARS-CoV-2 的刺突蛋白(S 蛋白)是 ACE2 的配体,二者相互作用促使病毒包膜与细胞膜融合,才能使病毒粒子进入细胞^[18]。SARS-CoV-2 的 S1 亚基包含受体结合结构域(RBD),能与 ACE2 结合,驱动 S 蛋白构象改变,但 SARS-CoV-2 通过 ACE2 侵入人体的致病机制尚未阐明^[24]。近期,*Science* 杂志报道了 SARS-CoV-2 受体 ACE2 的全长结构以及 S 蛋白的首个冷冻电镜结构,为探究冠状病毒识别和感染的分子基础提供了重要线索^[25-26]。鉴于 S 蛋白和受体结合在发病过程中的关键作用,通过研制特异性 ACE2 抗体阻断病毒与受体结合进而抑制病毒入侵是抗体药物治疗新冠肺炎的方法之一^[27]。

最后,本研究构建了 ACE2 蛋白的表达载体 pET22b-ACE2,并进行了原核表达,建立了 ACE2 蛋白的表达条件。结果显示,经 0.5 mmol/L IPTG 诱导、30 °C 培养 12 h 后 ACE2 蛋白出现过表达,且主要在沉淀中表达,考虑优先从沉淀中进行大规模纯化 ACE2 用于疫苗研发或结构分析。

综上,本文为深入了解 ACE2 生物学功能、探讨 SARS-CoV-2 入侵人体细胞的分子机制奠定了基础。通过不同物种 ACE2 蛋白同源性分析和功能评估,揭示了 SARS-CoV-2 的潜在宿主范围,有助于阐明病毒起源和跨物种传播给人类的机制,为 SARS-CoV-2 在人畜共患病方面的研究提供了理论依据,为研发抑制 SARS-CoV-2 和其他致命冠状病毒株的广谱抗病毒药物提供了线索。

参考文献:

- [1] HARRISON A G, LIN T, WANG P. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis [J]. *Trends Immunol*, 2020, 41(12):1100-1115. DOI:10.1016/j.it.2020.10.004.
- [2] V'KOVSKI P, KRATZEL A, STEINER S, *et al.* Coronavirus biology and replication: Implications for SARS-CoV-2 [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(3):155-170. DOI:10.1038/s41579-020-00468-6.
- [3] LAI C C, SHIH T P, KO W C, *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2020, 55(3):105924. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2020.105924.
- [4] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020, 579(7798):270-273. DOI:10.1038/s41586-020-2012-7.
- [5] LAMBERT D W, CLARKE N E, TURNER A J. Not just angiotensinases: New roles for the angiotensin-converting enzymes [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(1):89-98. DOI:10.1007/s00018-009-0152-x.
- [6] BASU A, SARKAR A, MAULIK U. Molecular docking study of potential phytochemicals and their effects on the complex of SARS-CoV2 spike protein and human ACE2 [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):17699. DOI:10.1038/s41598-020-74715-4.
- [7] CUI J, LI F, SHI Z L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(3):181-192. DOI:10.1038/s41579-018-0118-9.
- [8] 何晓波, 虞淦军, 吴艳峰. 新型冠状病毒突变株对传染性和疾病进展及免疫保护影响的研究进展 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(16):2021-2028. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2021.16.021.
- [9] CHAN K K, DOROSKY D, SHARMA P, *et al.* Engineering human ACE2 to optimize binding to the spike protein of SARS coronavirus 2 [J]. *Science*, 2020, 369(6508):1261-1265. DOI:10.1126/science.abc0870.
- [10] LI W, ZHANG C, SUI J, *et al.* Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2 [J]. *EMBO J*, 2005, 24(8):1634-1643. DOI:10.1038/sj.emboj.7600640.
- [11] CAMARGO S M, SINGER D, MAKRIDES V, *et al.* Tissue-specific amino acid transporter partners ACE2 and collectrin differentially interact with hartnup mutations [J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(3):872-882. DOI:10.1053/j.gastro.2008.10.055.
- [12] GUY J L, JACKSON R M, JENSEN H A, *et al.* Identification of critical active-site residues in angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) by site-directed mutagenesis [J]. *FEBS J*, 2005, 272(14):3512-3520. DOI:10.1111/j.1742-4658.2005.04756.x.
- [13] RUSHWORTH C A, GUY J L, TURNER A J. Residues affecting the chloride regulation and substrate selectivity of the angiotensin-converting enzymes (ACE and ACE2) identified by site-directed mutagenesis [J]. *FEBS J*, 2008, 275(23):6033-6042. DOI:10.1111/j.1742-4658.2008.06733.x.
- [14] SAPONARO F, RUTIGLIANO G, SESTITO S, *et al.* ACE2 in the era of SARS-CoV-2: Controversies and novel perspectives [J]. *Front Mol Biosci*, 2020, 7:588618. DOI:10.3389/fmolb.2020.588618.
- [15] 袁彩, 叶晓明, 黄明东. SARS-CoV Spike蛋白受体结合区的表达及纯化 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2006, 22(12):1108-1110. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2006.12.005.
- [16] KRISTIANSEN T Z, BUNKENBORG J, GRONBORG M, *et al.* A proteomic analysis of human bile [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3(7):715-728. DOI:10.1074/mcp.M400015-MCP200.
- [17] TOWLER P, STAKER B, PRASAD S G, *et al.* ACE2 X-ray structures reveal a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(17):17996-18007. DOI:10.1074/jbc.M311191200.
- [18] LI W, MOORE M J, VASILIEVA N, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus [J]. *Nature*, 2003, 426(6965):450-454. DOI:10.1038/nature02145.
- [19] CHEN R, JIANG X, SUN D, *et al.* Glycoproteomics analysis of human liver tissue by combination of multiple enzyme digestion and hydrazide chemistry [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(2):651-661. DOI:10.1021/pr8008012.
- [20] LIU Y, HU G, WANG Y, *et al.* Functional and genetic analysis of viral receptor ACE2 orthologs reveals a broad potential host range of SARS-CoV-2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(12):e2025373118. DOI:10.1073/pnas.2025373118.
- [21] ZHANG Q, ZHANG H J, HUANG K, *et al.* SARS-CoV-2 neutralizing serum antibodies in cats: A serological investigation [J]. *BioRxiv*, 2020. DOI:10.1101/2020.04.01.021196.
- [22] SHI J Z, WEN Z Y, ZHONG G X, *et al.* Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2 [J]. *Science*, 2020, 368(6494):1016-1020. DOI:10.1126/science.abb7015.
- [23] PALMER M V, MARTINS M, FALKENBERG S, *et al.* Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to SARS-CoV-2 [J]. *J Virol*, 2021, 95(11):e00083-21. DOI:10.1128/JVI.00083-21.
- [24] DONG Y T, DAI T, WEI Y J, *et al.* A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1):237. DOI:10.1038/s41392-020-00352-y.
- [25] YAN R H, ZHANG Y Y, LI Y N, *et al.* Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2 [J]. *Science*, 2020, 367(6485):1444-1448. DOI:10.1126/science.abb2762.
- [26] WRAPP D, WANG N, CORBETT K S, *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation [J]. *Science*, 2020, 367(6483):1260-1263. DOI:10.1126/science.abb2507.
- [27] 高慧婕, 李晓, 余燕, 等. 将新冠肺炎疫情相关知识引入医学免疫学在线教学的探讨 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(19):2343-2345. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2020.19.011.

[收稿 2021-09-17 修回 2021-10-27]

(编辑 周文瑜)

