SARS-CoV 蛋白质组的生物信息学及其进化关系

柳树群* 过涛* 季星来 孙之荣†

(清华大学生物科学与技术系, 生物信息学研究所, 北京 100084. * 同等贡献. † 联系人, E-mail: sunzhr@mail.tsinghua.edu.cn)

摘要 一种新的冠状病毒 SARS-CoV 是引起严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)的病原体. 对由 SARS 病毒全基因组序列推导出的所有蛋白质逐一进行分子量、等电点、分子消光系数等物理化学性质计算, 以及跨膜区和亚细胞定位预测, 辅以保守序列家族数据库搜索, 预测 SARS-CoV 功能未知蛋白质的功能. 同时, 通过 SARS-CoV 与其他冠状病毒蛋白质同源序列比较和进化距离计算, 分析 SARS 病毒的分类地位以及与其他冠状病毒的进化关系. 结果表明, 尽管 SARS 病毒是不同于其他 3 组冠状病毒的一种全新冠状病毒, 但在进化关系上更接近牛冠状病毒 BoCoV 和鼠肝炎病毒 MHV. 为实验测定 SARS 病毒蛋白质组以及抗 SARS 疫苗研制提供了参考和帮助.

关键词 SARS SARS-CoV 保守序列家族 序列比较 进化

2002 年 11 月, 第 1 例严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)病例在中国广东省发现. 之后, SARS 传播至香港、越南、新加坡、加拿大等 31 个国家和地区. 截止 2003 年 5 月 28 日, 全球累计 8221 人被感染, 死亡 735 人, 其中中国内地累计 5332 人被感染, 死亡 321 人, 死亡率由世界卫生组织(World Health Organization, WHO)最初公布的约 4% 上升到约 15% (<http://www.who.int/csr/sars/>).

2003 年 4 月, 世界卫生组织宣布, 在中国、德国、加拿大等 10 个国家和地区的 13 个实验室的共同努力下, 正式确认一种新的冠状病毒(Coronavirus)为引起 SARS 的病原体, 并将其命名为 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)^[1-3]. 加拿大、中国内地及香港、美国和新加坡的科学家相继公布了他们测定的 SARS 病毒基因组^[3-7]. 截止 2003 年 5 月 30 日, NCBI 的 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 已经收录了 SARS 病毒相关核酸序列 27 条, 其中完整的 SARS 病毒基因组 14 个.

冠状病毒属于 Nidovirales 目 Coronaviridae 科 *Coronavirus* 属, 它寄生于人类和其他动物的细胞质内, 能够引起宿主呼吸系统和消化系统疾病. 这种病毒含有一条约 30000 个核苷酸长的正链 RNA, 是已知的拥有最大基因组的 RNA 病毒. 目前发现的冠状病毒按血清型可分为 3 个组, 第 1 组和第 2 组包含哺乳动物冠状病毒, 而第 3 组只包含鸟类冠状病毒. 在每一组中, 依据病毒侵染的宿主范围、抗原关联程度以及基因组的组织形式, 冠状病毒被分为不同的种. 每一种冠状病毒都只能侵染特定的宿主, 同时病毒

对体外培养的条件要求相当苛刻. 冠状病毒能够引起很多动物的严重传染性疾病, 如禽支气管炎、猫腹膜炎、猪肠胃炎等, 常常造成畜牧业的巨大损失^[8]. 以前发现的两种人类冠状病毒 HCoV-229E 和 HCoV-OC43 分别属于第 1 类和第 2 类冠状病毒, 人类约 30% 的流行性感冒和上呼吸道感染是由这两种病毒引起的^[9]. 冠状病毒一旦进入细胞, 其 RNA 的 5' 端可读框 ORF1ab 即被翻译成一条很长的多蛋白体链(polypeptide), 该多蛋白体被病毒自身编码的蛋白酶水解为多个蛋白质产物^[5], 其中包括 3C-like 蛋白酶(3CL^{pro}, chymotrypsin-like proteinase)、RNA 依赖的 RNA 聚合酶(Rep, RNA-dependent RNA polymerase)以及 ATP 螺旋酶(Hel, ATPase-Helicase)等. Rep 和 Hel 负责病毒基因组的复制和转录, 病毒 mRNA 被宿主细胞的核糖体翻译成各种病毒蛋白质. 其中包括 4 种主要结构蛋白质(structural protein): 核壳体蛋白 N(nucleocapsid)、刺突蛋白 S(spike)、膜蛋白 M(membrane)和小包被蛋白 E(small envelope), 它们全部为糖蛋白(glycoprotein). 新复制出的全长正链 RNA 首先与核壳体蛋白 N 结合形成 RNA-蛋白质复合物, 然后该复合物与位于内质网膜上的 M 蛋白和 E 蛋白装配形成新的病毒颗粒, 病毒颗粒被内质网膜出芽的小囊泡运送到高尔基体, 最终以类似于胞分泌的形式释放出细胞^[10]. 需要指出的是, 位于病毒膜上的 S 蛋白是决定病毒宿主和组织特异性的关键蛋白质, 因为病毒是通过 S 蛋白与细胞表面的特殊受体相互作用而侵入细胞的^[8].

目前 NCBI GenBank 数据库收录的 14 条完整

SARS-CoV 基因组序列, 长度变化范围为 29712~29751 个核苷酸, 序列差异约为 0.1%, 整个基因组的 G-C 含量约为 41%, SARS-CoV 基因组的组织形式与其他冠状病毒相同, 从 5'端开始依次为复制酶基因 *rep*, 刺突蛋白基因 *S*, 小包被蛋白基因 *E*, 膜蛋白基因 *M*, 核壳蛋白基因 *N*^[5,6]. 其中 *rep* 基因约占整个基因组的 2/3, 它包含可读框 ORF1a 和 ORF1b, 这两个 ORF 经过共翻译水解而产生大量蛋白质产物. 同时, *S* 基因与 *E* 基因之间, *M* 与 *N* 之间以及 *N* 基因下游的区域编码一些非结构蛋白质(non-structural protein), 这些非结构蛋白在不同的冠状病毒之间差别很大, 功能还不清楚^[4-6].

本研究利用生物信息学手段, 对所有 SARS-CoV 相关蛋白质进行分子量、等电点、分子消光系数等物理化学性质计算以及跨膜螺旋区和亚细胞定位预测, 同时对每个 SARS-CoV 蛋白质进行保守序列家族和同源蛋白质序列搜索, 进一步对 SARS-CoV 的蛋白质与其他冠状病毒的对应蛋白质进行了进化距离计算和分析.

1 材料与方法

在蛋白质序列数据库 SWISS-PROT(<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>)中以“SARS”为关键词搜索 SARS-CoV 相关的蛋白质序列. 由于 SWISS-PROT 数据库中收录的 SARS-CoV 相关蛋白质序列参考了 GenBank 数据库中对应的所有核酸序列, 因此, 来自 SWISS-PROT 数据库的蛋白质序列比 GenBank 的蛋白质序列更具有代表性^[11]. SWISS-PROT 数据库收录了 10 个 SARS-CoV 相关蛋白质, 包括可读框 ORF1ab 对应的蛋白产物, 结构蛋白 *S*, *E*, *M*, *N* 以及功能未知的蛋白 *X1*~*X4*. 将这些蛋白质与 GenBank 中编号为 AY274119 的 SARS-CoV 全基因组的可读框一一进行比较, 发现可读框 ORF9~11 和 ORF 14 编码的蛋白质没有被 SWISS-PROT 数据库收录. 所有 SARS-CoV 相关蛋白质(包括 SWISS-PROT 收录的蛋白质以及由 SARS-CoV 基因组 ORF 推测出的蛋白质)列于表 1. 对其他冠状病毒的研究表明^[12], 可读框 ORF1ab 占据了约 2/3 的基因组长度, 具体分为两个阅读框 ORF1a 和 ORF1b, 当核糖体翻译到 ORF1a 和 ORF1b 交界处 13392~13398(5'-UUUAAAC-3')位置时, 核糖体对

ORF1b 进行了-1 位的移框阅读, 同时在 ORF1a 和 ORF1b 翻译过程中, 翻译出来的多蛋白质体经历了一系列水解过程, 首先得到 PLP^{pro} (papain-like proteinase)和 3CL^{pro}, 接着生成了包括 Rep 和 Hel 在内的一系列蛋白质产物. 通过对 SARS-CoV 可读框 ORF1ab 的切割位点分析, 共得到 14 个蛋白产物(表 2), 由于这些蛋白产物真正存在于病毒的侵染周期中, 我们对这 14 个蛋白质而不是对 ORF1ab 对应的整条蛋白序列进行了生物信息学计算和分析.

首先, 用 SAPS(statistical analysis of protein sequence)程序^[13]统计每个 SARS-CoV 蛋白质的氨基酸组成、可能出现的重复序列模式以及电荷分布, 用 PI 程序^[1]和 EXTCOE(extinction coefficient calculation)程序^[14]分别计算每个蛋白质的等电点和消光系数, 用 TMAP^[15]和 TMHMM2.0^[16]程序预测蛋白质的跨膜片段和跨膜螺旋区, 以确定蛋白质可能的亚细胞定位. 用 HMMPFAM^[17]和 BLIMPS^[18]方法分别在 HMM 数据库和 BLOCKS 数据库中搜索可能匹配的蛋白质保守序列家族. 最后, 利用 Workbench 生物信息学平台^[14]提供的 PSIBLAST 程序^[19]在非冗余蛋白质序列数据库(non-redundant protein database(SDSC))中搜索每个 SARS-CoV 相关蛋白的同源序列(选择 BLOSUM80 矩阵, 最大迭代次数 6), 并用 CLUSTALW 程序^[20]对搜索到的同源序列进行多序列比对, 根据比对结果, 用 DRAWTREE 和 DRAWGRAM^[21]绘制进化树, 并使用 PROTDIST 程序^[2]计算蛋白质序列之间的进化距离矩阵, 以期阐明 SARS-CoV 与其他冠状病毒之间的进化关系.

2 结果和讨论

与其他冠状病毒一样, SARS-CoV 的蛋白质分为结构蛋白和非结构蛋白, 前者如 *S*, *E*, *M*, *N* 等, 它们是病毒蛋白质外壳的组成成分, 后者如 3CL^{pro}, Rep 和 Hel 等, 分别负责病毒蛋白质的水解和病毒 RNA 的复制和转录. 此外, SARS-CoV 还包含大量的功能未知蛋白(function unknown protein), 这些蛋白是由病毒基因组序列的可读框 ORF 推测出来的, 如 *X1*, *X2*, *X3*, *X4*, *X5* 等. 本文对所有 SARS-CoV 的相关蛋白质进行了生物信息学计算和分析, 每个蛋白质的序列长度、分子量、消光系数以及等电点等物理化学

1) Program by Dr Luca Toldo, developed at <http://www.embl-heidelberg.de>

2) Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.5c. 1993 <https://engr.sciichina.com/doi/10.1360/csb2003-48-13-1359>

性质列于表 1 和表 2.

2.1 ORF1ab 编码的蛋白质产物分析

可读框 ORF1ab 编码的多蛋白体经过共翻译水解过程(con-translational proteolytic processing), 产生约 14 个蛋白产物(表 2). 其中前导蛋白(LP, leader protein)是一个分子量为 19.6 kD 的酸性蛋白质, 正电氨基酸(KR)占 10.1%, 负电氨基酸(ED)占 14.5%, TMAP 和 TMHMM 预测没有发现该蛋白质中存在任何跨膜片段. BLIMPS 搜索发现, 前导蛋白中 25~49 肽段与 BLOCKS 数据库中 IPB001407D 保守序列模式相匹配, IPB001407D 来自流感病毒的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶. PSIBLAST 搜索发现, 前导蛋白中部分序列片段分别与内因子-维生素 B₁₂ 受体(intrinsic factor-

vitamin B₁₂ receptor)、维生素 B₁₂ 的受体蛋白质 cubilin、阳离子转运蛋白/ATP 酶(cation transporter/ATPase)、氨肽酶(amino-peptidase N)等蛋白质的部分序列片段有 30%左右的同源性.

P65 是分子量为 70.7 kD 的弱酸性蛋白, TMAP 预测 400~424, 467~486 位置存在两个潜在的跨膜片段, 而 TMHMM 没有预测出任何跨膜螺旋片段. BLIMPS 搜索发现 508~545 肽段与 IPB001156 (transferring, 转铁蛋白)保守序列家族相匹配, HMMPFAM 搜索发现 142~185 和 291~351 片段分别与 HMM 数据库中的 PF05256(uncharacterised protein family, 无典型特征的蛋白质家族)和 PF00087 (snake toxin, 蛇毒蛋白)匹配. PSIBLAST 搜索发现, P65 的部分序列分别与黄果

表 1 SARS-CoV 相关蛋白质的物理化学性质

蛋白质	数据库登录号 ^{b)}	长度(aa)	分子量/kD	Extcoef ^{c)} /(mol/L) ⁻¹ ·cm ⁻¹	pI ^{d)}	功能分类
ORF1ab	P59641	7073	790.3	866830	6.2	多蛋白质体
S	P59594	1255	139.1	134050	5.4	结构蛋白
X1	P59632	274	30.9	50690	5.7	结构蛋白 ^{e)}
X2	P59633	154	17.8	9770	11.2	非结构蛋白 ^{e)}
E	P59637	76	8.3	5300	6.3	结构蛋白
M	P59596	221	25.1	51530	9.8	结构蛋白
X3	P59634	63	7.5	8250	4.4	N/A ^{f)}
X4	P59635	122	13.9	6760	8.0	结构蛋白 ^{e)}
ORF9	AY274119	44	5.3	7079	3.4	结构蛋白 ^{e)}
ORF10	AY274119	39	4.3	360	8.0	N/A ^{f)}
X5	AY274119	84	9.6	21210	9.5	非结构蛋白 ^{e)}
N	P59595	422	46.0	42530	10.5	结构蛋白
HP5 ^{a)}	P59636	98	10.8	1280	4.7	N/A ^{f)}
ORF14	AY274119	70	7.8	8490	6.3	N/A ^{f)}

a) 假设的蛋白质 5 (hypothetical protein 5); b) P596xx 为 Swiss-Prot 数据库编号, AY274119 为 GenBank 数据库编号; c) Extcoef 为 280 nm 波长下的分子消光系数; d) pI 为等电点; e) 本文推测的蛋白质可能的功能(详见正文); f) 蛋白质的功能未知(function not available)

表 2 可读框 ORF1ab 推测出来的蛋白质产物的物理化学性质

ORF 产物	ORF	起始位置	长度(aa)	分子量/kD	Extcoef/(mol/L) ⁻¹ ·cm ⁻¹	pI
LP	ORF1a	1~179	179	19.6	13370	5.2
P65 ^{a)}	ORF1a	180~818	639	70.7	63150	6.0
PLP	ORF1a	819~3239	2421	269.7	28110	5.4
3CL ^{pro}	ORF1a	3240~3547	308	33.8	31870	6.2
HD2/NSP3	ORF1a	3548~3836	289	33.0	59180	8.9
NSP4 ^{b)}	ORF1a	3837~3919	83	9.3	5870	5.0
NSP5	ORF1a	3920~4117	198	21.9	20460	6.7
NSP6	ORF1a	4118~4229	112	12.4	12270	9.2
GFLP	ORF1a	4230~4369	140	14.8	12870	6.3
Rep	ORF1a, ORF1b	4370~5301	932	106.5	127310	6.0
Hel	ORF1b	5302~5902	601	66.9	62150	8.2
NSP11	ORF1b	5903~6429	527	59.9	89000	7.3
NSP12	ORF1b	6430~6775	346	38.5	31450	4.9
NSP13	ORF1b	6776~7073	298	33.0	56710	7.8

a) 该蛋白对应于鼠肝炎病毒 MHV 的 P65 蛋白, b) NSP 表示功能未知蛋白质

蝇(*Drosophila melanogaster*), 细胞膜外蛋白质B (extracellular matrix protein B), 线粒体内的核糖体蛋白 (mitochondrial ribosomal protein), 假设的 12.7 kD 的蛋白质(其编码区位于 16S 和 23S RNA 编码 DNA 之间, Hypothetical 12.7 kD protein in 16S-23S DNA spacer)以及无害利斯特菌(*Listeria innocua*)等蛋白的部分序列片段有 30%左右的同源性。

PLP^{pro} 蛋白质是分子量为 269.7 kD 的强酸性蛋白质, 含有丰富的半胱氨酸(3%), 其中 111~183 序列 DEEEEDDAECEEIEIDETCEHEYGTEDDYQGLPLEFGASAETVRVEEEEEEDWLDDTTTEQSEIEPEPEPTPEE 为强负电区域。TMAP 和 TMHMM 预测出 PLP^{pro} 含有 7 个跨膜螺旋片段, 而 N 末端相当长的一段区域 1~1390 位于病毒粒子外部或内质网/高尔基体(ER/Golgi)内部, C 末端 112 个氨基酸残基位于病毒粒子内部或细胞质内。HMMPFAM 分析发现 PLP^{pro}44~182, 218~326, 790~1065, 1216~1416, 2152~2312 区域分别与保守序列家族 PF05066(RNA_pol_delta)、PF01661(A1pp)、PF01831(peptidase_C16)、PF03649(UPF0014)、PF01891 (CbiM)相匹配。BLIMPS 搜索发现 PLP^{pro} 的部分序列分别与 BLOCKS 数据库中的保守蛋白序列 IPB002589 (domain of unknown function DUF27, 功能未知结构域 DUF27)、IPB001509 (NAD dependent epimerase/dehydratase family, NAD 依赖的差向异构酶/脱水酶)、IPB001394 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family 2, 泛素羧端水解酶家族)、IPB000135 (high mobility group proteins HMG1 and HMG2, 高迁移率组分蛋白质 HMG1 与 HMG2)、PR00375 (Huntingtin signature, Huntingtin 舞蹈症蛋白质信号)相匹配。PSIBLAST 搜索表明, SARS-CoV PLP^{pro} 与老鼠肝炎病毒 MHV, 牛冠状病毒 BoCoV, 禽支气管炎病毒 AIBV, 人冠状病毒 HCoV229E 以及传染性肠胃炎病毒 TGEV 的 PLP^{pro} 有 30%~40%的序列同源性。以上结果表明, PLP^{pro} 很有可能执行蛋白质水解功能。

3CL^{pro} 是分子量为 33.8 kD 的酸性蛋白质, 含有两个重复两次的肽段 TTTLN(24~28, 224~228 位置)和 AGTD(173~176, 194~197 位置), TMHMM 没有预测到跨膜螺旋结构, BLIMPS 和 HMMPFAM 没有搜索到相匹配的蛋白保守结构域, PSIBLAST 搜索发现 3CL^{pro} 除了与 MHV, BoCoV, AIBV, HCoV-229E, AIBV 以及猪流行性痢疾病毒 PEDV 的 3CL^{pro} 有 40%~50%的序列相似性以外, 还与蛋白质水解酶(Hydrolase)的 2879~3180 片段有 43.8%的相似性, 表明 3CL^{pro} 有水

解蛋白质的功能。

Rep 是分子量为 106.5 kD 的酸性蛋白质, TMAP 和 TMHMM 分析没有发现跨膜片段存在, HMMPFAM 搜索发现 Rep 与 HMM 数据库中的 PF00680 保守序列家族相匹配, PF00680 来自 RNA 依赖的 RNA 聚合酶, PSIBLAST 搜索结果表明, SARS-CoV 的 Rep 与其他冠状病毒的 Rep 有 60%左右的序列同源性。Hel 是分子量为 66.9 kD 的碱性蛋白质, TMAP 和 TMHMM 没有预测到跨膜片段的存在, HMMPFAM 搜索发现 Hel 与 HMM 数据库中的 PF01443 (viral_helicase1 viral (superfamily 1) RNA helicase, 病毒螺旋酶 1 病毒(超家族)RNA 螺旋酶)保守序列匹配, PSIBLAST 搜索结果表明, SARS-CoV 的 Hel 与其他冠状病毒的螺旋酶有 60%左右的同源性, 其中位于 282~288 的富含甘氨酸肽段 GPPGTGK 相当保守, 它形成一个位于 β -链和 α -螺旋结构之间的柔性环, 该环能够与核苷酸的磷酸基团发生作用而参与解螺旋, 被称为 P-loop^[22]。以上分析说明, 冠状病毒的 3CL^{pro}, Rep 和 Hel 具有很强的保守性。

HD2/NSP3 是分子量为 33.0 kD 的碱性蛋白质, TMHMM 分析表明该蛋白含有 7 个跨膜的 α 螺旋, N 末端 1~11 残基位于病毒粒子内部, C 末端 236~290 残基位于病毒外部, 其中 209~219 是一段富含半胱氨酸的序列 CIMLVYCFLGYCCCCYFGLFC。PSIBLAST 搜索和序列比对结果表明, SARS-CoV HD2/NSP3 蛋白与其他冠状病毒的序列同源性约在 30%左右。HMMPFAM 搜索发现, HD2/NSP3 的 43~140 肽段与 HMM 数据库的 PF00420(NADH-ubiquinone/plastoquinone oxidore, NADH-辅酶Q/泛醌氧化酶)保守序列匹配, BLIMPS 搜索发现该蛋白的部分序列分别与 BLOCKS 数据库中的 IPB001169 (integrin beta, C-terminus, 整合 β 蛋白 C-末端)、IPB002561 (filovirus glycoprotein, 丝状病毒糖蛋白)、IPB000832(G-protein coupled receptors family, G-蛋白耦联受体家族)、IPB002091(aromatic amino acids permease, 芳香族氨基酸透性酶)保守序列相匹配, 暗示 HD2/NSP3 蛋白很可能是位于病毒膜上的 G-蛋白耦联受体家族成员, 具有信号传导功能。

NSP4 是一个分子量为 9.3 kD 的酸性蛋白质, 它含有两段重复两次的序列 VLLS(12~15, 58~61 位置)和 LLSVL(13~17, 55~59 位置)。与其他冠状病毒相比较, NSP4 序列同源性约为 40%左右。TMHMM 分析没有发现跨膜螺旋, BLIMPS 和 HMMPFAM 搜索没有发

现任何匹配的保守序列家族. NSP5 是分子量为 21.9 kD 的中性蛋白, 没有预测到跨膜片段. HMMPFAM 分析发现, NSP5 的 16~117 肽段与 HMM 数据库的 PF04233 (phage Mu protein F like protein, 噬菌体 Mu 蛋白质类 F 蛋白)保守序列匹配, 29~140 肽段与 PF04696 (pinin/SDK/memA/protein conserved region, pinin/SDK/memA/蛋白保守区域)相匹配, BLIMPS 搜索发现 NSP5 的部分序列分别与 BLOCKS 数据库中的 IPB003660 (HAMP domain, HAMP 结构域)、PR00331 (haemagglutinin HA2 chain signature, 血球凝集素 HA2 链信号)、PR00329 (haemagglutinin HA1/HA2 chain signature, 血球凝集素 HA1/HA2 链信号)保守序列模式匹配. 序列比对表明, SARS-CoV 的 NSP5 与其他冠状病毒的序列同源性约为 40% 左右. NSP6 是分子量为 12.4 kD 的强碱性蛋白, TMAP 和 TMHMM 分析没有得到跨膜片段, BLIMPS 和 HMMPFAM 没有搜索到相匹配的保守序列模式, PSIBLAST 搜索和序列比对表明不同冠状病毒的 NSP6 蛋白序列同源性为 45% 左右.

生长因子样蛋白 GFLP (growth factor like protein) 是分子量为 14.8 kD 的酸性蛋白质, 不含跨膜区. BLIMPS 搜索发现该蛋白的 73~86 肽段与 BLOCKS 数据库中的 IPB000315 (B-box zinc finger superfamily, B-盒锌指超家族)保守序列模式匹配, 36~74 肽段与 IPB003854 (Gibberellin regulated protein, 赤霉素调节蛋白)匹配. GFLP 在不同冠状病毒间的序列同源性约为 55% 左右.

蛋白质 NSP11, NSP12, NSP13 中都没有预测到跨膜螺旋的存在. BLIMPS 搜索表明, NSP11 的 101~117 和 247~257 肽段分别与 BLOCKS 数据库中的 PR00059 (ribosomal protein L6 signature, 核糖体 L6 蛋白质信号)和 IPB001608 (uncharacterized pyridoxal-5'-phosphate dependent enzyme family, 非典型维生素 b6-5'-依赖酶家族)保守序列模式相匹配, NSP13 的 179~215 肽段与 IPB000903 (myristoyl-CoA : protein N-myristoyltransferase, 肉豆蔻酰-辅酶 A : 蛋白质-肉豆蔻酰转移酶)匹配. HMMPFAM 搜索发现, NSP13 的 50~213 肽段与 HMM 数据库中的 PF01728 (FtsJ-like methyltransferase, 类-FtsJ 甲基移换酶)保守结构域匹配. 没有在 HMM 和 BLOCKS 数据中找到与 NSP12 匹配的保守蛋白序列. 不同冠状病毒的 NSP11~13 序列同源性分别约为 50%, 40% 和 60% 左右.

以上结果表明, SARS-CoV ORF1ab 编码的蛋白

质产物与其他冠状病毒对应的蛋白质在序列上有很强的保守性. BLIMPS, HMMPFAM 以及 PSIBLAST 搜索到的保守序列家族大多来自蛋白酶, 暗示 ORF1ab 编码的蛋白质产物在病毒的生活周期中行使各种各样的催化功能.

2.2 SARS-CoV 结构蛋白质分析

冠状病毒的 S 蛋白是一类较大的膜糖蛋白质, 大部分氨基酸残基位于病毒粒子表面, 形成了病毒表面的主要突起物, S 蛋白三聚体使得病毒在电子显微镜下呈现皇冠状形态. 多数冠状病毒的 S 蛋白在合成后被水解成 S1 和 S2 两个亚基, 其中 S1 亚基负责与宿主细胞受体的识别和相互作用, S2 亚基负责病毒与细胞膜融合, 因而, 冠状病毒的毒性强弱和宿主特异性是由 S 蛋白决定的^[8]. SARS-CoV 的 S 蛋白由 1255 个氨基酸残基组成, 分子量为 139.1 kD, 等电点为 5.4, 是强酸性蛋白, 其 529~533, 837~841 位置各含有一个 FNGLT 重复片段. TMHMM 分析发现, S 蛋白靠近 C 末端的 1196~1218 位置有一跨膜 α 螺旋, 而 N 末端 1~1195 区域位于病毒粒子表面, C 末端 1219~1255 亲水区域位于病毒内部, 其中 1217~1236 (CCM-TSCCSCLKGACSCGSCC) 为富含半胱氨酸的肽段. HMMPFAM 搜索发现, SARS-CoV 的 75~609 区域与 HMM 数据库中冠状病毒 S1 结构域 PF01600 保守序列匹配, 641~1247 区域与 PF016001 (冠状病毒 S2 结构域)保守序列相匹配. 其他冠状病毒 S 蛋白剪切位点的序列特征通常为 RRXRR, RXRR, 但是对于 SARS-CoV, 没有搜索到这样的碱性剪切位点, 因此, SARS-CoV 的 S 蛋白很有可能是以 S1 和 S2 两个结构域形式而不是以 S1 和 S2 亚基形式存在. 通过 PSIBLAST 搜索其他冠状病毒 S 蛋白序列以及 CLUSTALW 序列比对, 我们发现 SARS-CoV 的 S2 较 S1 在序列上更为保守, 前者与其他冠状病毒的序列同源性为 18%~21%, 后者为 34%~35%, 这一结果能够很好地解释 S 蛋白的功能: S1 负责与特异性受体的识别和结合, 由于不同冠状病毒侵染不同的类型的宿主细胞, 因此 S1 亚基具有多样性; 而 S2 亚基负责病毒膜与细胞膜的融合, 这种功能上的单一性使得不同冠状病毒的 S2 亚基相对保守. 目前, 冠状病毒的侵染机制可以用坍塌模型 (collapse model) 来解释: 首先, S1 亚基通过与宿主细胞膜上的特异性受体作用而发生构象变化, 这种构象变化能够诱导 S2 亚基发生结构改变, 具体地讲, S2 C 端的多个双亲性 α 螺旋坍塌成

coiled-coil 构象,使得S2的融合肽段靠近并插入细胞膜,导致膜融合^[8].我们用Workbench生物信息学平台提供的8种蛋白质二级结构预测方法对S蛋白质进行了二级结构预测,发现750~1010区域能够形成9个连续的 α 螺旋结构(图1),进一步用GREASE方法^[23]分析S蛋白的亲疏水特性,发现885~950,973~990区域呈现明显的亲水性和疏水性交替出现的性质,说明这部分区域很可能是发生构象坍塌的双亲性 α 螺旋区域.最近的研究指出,HCoV-229E S蛋白的417~547氨基酸区域是病毒结合人类细胞膜受体氨肽酶N所必须的^[24],我们将SARS-CoV S蛋白与229E的S蛋白进行序列比对,发现SARS-CoV S蛋白的492~651区域与229E的417~547区域相对应,但是,S蛋白的492~651区域是否是SARS病毒结合受体所必须的,需要进一步的实验验证.

SARS-CoV E蛋白是包含76个氨基酸的小酸性蛋白质,分子量为8.3 kD. TMAP和TMHMM分析发现E蛋白的12~34位置存在一疏水跨膜螺旋区域,残基1~11位于病毒内部,而35~76亲水肽段位于病毒表面. HMMPFAM搜索发现E蛋白整条序列与HMM数据库中的PF02723(NS3/small envelope protein E, NS3/小包被蛋白质E)保守序列相匹配, BLIMPS搜索也发现E蛋白的36~67区域与BLOCKS数据库中的冠状病毒小包被蛋白序列家族IPB003873相匹配.但是,PSIBLAST搜索只找到两种冠状病毒具有与HCoV-E蛋白同源的蛋白序列,它们是鼠肝炎病毒MHV和鼠腮腺炎冠状病毒RSCoV (rat sialodacryoadenitis coronavirus),与SARS-CoV E蛋白的序列同源性分别为23%和24%,说明E蛋白在冠状病毒进化中较为不保守.此外有研究发现,猪肠胃炎病毒TGEV的E蛋白对病毒复制起关键作用^[25],但是在鼠肝炎病毒MHV中,E蛋白基因的删除只能使病毒复制效率降低^[26]. SARS-CoV的E蛋白除了参与病毒外壳形成外是否对病毒复制起作用,需要进一步研究才能确定.

M蛋白质是包含221个氨基酸的碱性蛋白,分子量为25.1 kD. 其N端44~97氨基酸组成一强疏水区域,21~24以及137~140位置各包含一段重复序列LVIG. PSIBLAST搜索和序列比对发现,SARS-CoV 109~114位置存在相当保守的一段序列WSFNPE,而不同冠状病毒M蛋白整体上的序列同源性仅30%左右. TMHMM方法预测到3个跨膜螺旋片段:15~37,

50~72, 77~99, N端1~14和C端100~221肽段分别位于病毒粒子外部和内部. 位于病毒内部的肽段含有丰富的正电氨基酸,推测能够与N蛋白或病毒RNA发生相互作用. HMMPFAM和BLIMPS搜索均发现,SARS-CoV M蛋白全序列与冠状病毒M糖蛋白(Coronavirus M matrix/glycoprotein, PF01635, IPB00-2574)保守序列家族相匹配,说明SARS-CoV M蛋白是比较典型的冠状病毒M蛋白. 此外, BLIMPS搜索还发现,M蛋白的部分序列与BLOCKS数据库中的IPB001717 (anion exchanger family, 阴离子交换器家族)、IPB001425 (bacterial rhodopsin, 细菌视紫红质)、IPB001712 (bacterial export FHIPEP family, 细菌输出FHIPEP家族)相匹配,暗示M蛋白可能与离子交换和信号传导有关. 此外,对其他冠状病毒的研究表明,S蛋白与M蛋白的相互作用是病毒外壳蛋白积累和包装的关键步骤^[10], SARS-CoV S蛋白的等电点pI为5.4, M蛋白为9.8,可以推测,二者之间的静电相互作用对病毒装配起一定的作用.

N蛋白是包含422个氨基酸的强碱性蛋白,分子量为46.0 kD,其191~195和203~207位置各有一段重复序列SRGNS. TMAP和TMHMM方法都没有预测到N蛋白中有跨膜螺旋的存在. 通过PSIBLAST搜索和序列比对,我们发现N蛋白的107~118位置有一段相当保守的序列PRWYFYLLGTGP,目前还不清楚此保守序列的功能. 此外,SARS-CoV N蛋白的373~390位置有一段富含赖氨酸的序列KKKKTDEA-QPLPQRQKKQ,该序列与PFAM数据库中的双向核定位信号(bipartite nuclear targeting signal) QDOC50079相匹配,负责核酸的识别和结合. N蛋白的177~207位置还有一段富含丝氨酸的亲水氨基酸序列SRGGSQASSRSSRSRGNSTPGSSRGNS,该序列是否与核酸作用还不清楚. BLIMPS搜索发现N蛋白除了与BLOCKS数据库中的IPB001218 (Coronavirus nucleocapsid protein, 冠状病毒核壳体蛋白)匹配外,部分序列还分别与IPB002565 (Orbivirus NS3, 环状病毒NS3)、IPB000096 (serum amyloid A protein, 血清淀粉样A蛋白)、IPB001677 (transferrin binding protein, 转铁蛋白结合蛋白)、IPB000689 (UbiH/COQ6 monooxygenase family, UbiH/COQ6单加氧酶家族)等序列家族相匹配. 不同冠状病毒的N蛋白保守性不是很强,序列同源性约为30%左右.

2.3 功能未知蛋白分析

由SARS-CoV基因组推测的X1蛋白质是一个包

图1 8种二级结构预测方法预测出的S蛋白二级结构
方框表示3种以上预测方法预测出的 α 螺旋区域H1~H9

含 274 个氨基酸的酸性蛋白质, 分子量为 30.9 kD. 序列分析发现 79~115 位置有一强疏水片段 FICNLL-LFVTIYSHLLLVAAAGMEAQFLYLYALIYFL. TMAP 和 TMHMM 预测到 3 个跨膜的螺旋区域: 34~56, 77~99, 103~125, N 末端 1~33 残基位于病毒粒子外部, 而 C 末端 126~274 肽段位于病毒内部. PSIBLAST 没有搜索到与 X1 同源的蛋白质序列, HMMSPFAM 没有

搜索到与 X1 相匹配的任何保守序列家族. BLIMPS 搜索发现, X1 的 231~252 肽段与 BLOCKS 数据库中的 PR01542 (foot-and-mouth disease virus VP1 coat protein signature, 口足疾病病毒 VP1 外壳蛋白信号) 保守序列匹配, 67~87 肽段与 PR00699 (*C. elegans* integral membrane protein Srb signature, 线虫整合膜蛋白 Srb 信号) 保守序列匹配, 暗示 X1 可能是存在于

SARS-CoV 蛋白质外壳上的结构蛋白。

X2 是包含 154 个氨基酸残基的强碱性蛋白质, 其正电氨基酸赖氨酸 + 精氨酸含量与负电氨基酸精氨酸 + 甘氨酸含量的比例为 22: 1。X2 蛋白序列的 28~31 以及 95~98 位置各有一小段重复序列 SLLK。PSIBLAST 没有搜索到与 X2 同源的其他冠状病毒蛋白序列。C 末端 137~154 KKVSTNLCTHSFRKKQVR 序列与 PFAM 数据库中的双向核定位信号 PS50079[NLS_BP (bipartite nuclear localization signal)] 相匹配。TMAP 和 TMHMM 分析没有预测到任何跨膜螺旋片段的存在。以上结果暗示 X2 蛋白很可能与 N 蛋白相似(详见对 N 蛋白的讨论), 位于病毒粒子内部, 行使与 RNA 结合的功能, 同时 X2 蛋白在病毒包装过程中可能起关键作用。

X3 蛋白是包含 63 个氨基酸的小酸性蛋白质, 分子量为 7.5 kD。PSIBLAST 搜索没有找到任何该蛋白的同源序列, HMMPFAM 和 BLIMPS 分析也没有发现任何匹配的保守序列家族。TMHMM 没有预测到跨膜 α 螺旋, 但是 TMAP 分析发现 9~37 位置可能存在一段跨膜片段, N 末端 1~8 区域位于病毒外部, 根据以上信息不足以推测 X3 蛋白的功能。X4 蛋白是包含 122 个氨基酸的碱性蛋白, 分子量为 13.9 kD。其 101~115 位置有一强疏水片段 LFLIVAALVFLILCF, TMAP 和 TMHMM 同时预测到 X4 的 95~117 位置存在一个跨膜 α 螺旋结构, N 末端 1~94 区域位于病毒粒子外部, 而 C 末端 118~122 肽段位于病毒内部, 我们还注意到 C 末端尾巴 118~120 位置有 3 个连续的碱性氨基酸 KKK, 推测它们很可能与核酸发生作用。BLIMPS 搜索发现 X4 蛋白的 101~119 序列与 BLOCKS 数据库的四环素抗性蛋白 TetB 信号 PR01036 (tetracycline resistance protein TetB signature, 四环素抗性蛋白 TetB 信号) 序列家族匹配, 而 PSIBLAST 搜索没有发现 X4 的同源蛋白序列。以上分析表明, X4 蛋白很可能是位于病毒膜上的结构蛋白, 对病毒粒子的装配可能起一定的作用。X5 蛋白是包含 84 个氨基酸的碱性蛋白质, 分子量为 9.5 kD, PSIBLAST 没有搜索到其他冠状病毒的同源蛋白序列。TMAP 和 TMHMM 没有预测到跨膜片段。BLIMPS 搜索发现 X5 的 52~68 序列与 BLOCKS 数据库中的 IPB000001(kringle, 一种环状结构蛋白) 保守序列家族匹配。这些分析表明, X5 蛋白质很可能位于病毒粒子内部, 其 N 末端和 C 末端的强正电区域可能会与

核酸或 M 蛋白发生作用, 促进病毒装配。

HP5 是分子量为 10.8 kD 的强酸性蛋白质, 它包含 98 个氨基酸残基。TMAP 和 TMHMM 没有预测到跨膜片段。HMMPFAM 和 BLIMPS 没有搜索到与该蛋白匹配的保守序列模式, PSIBLAST 搜索没有发现任何同源蛋白质序列。根据以上信息不足以推测 HP5 的功能。

可读框 ORF9 编码一个包含 44 个氨基酸的小酸性蛋白质, 分子量为 5.3 kD。负电氨基酸全部集中在蛋白质的 N 末端和 C 末端。PSIBLAST 没有搜索到任何同源序列。TMAP 和 TMHMM 预测 9~31 位置存在一段跨膜 α 螺旋, N 端 1~8 肽段位于病毒内部, 而 C 端 32~44 区域位于病毒表面。BLIMPS 搜索发现 ORF9 的 11~32 序列与 BLOCKS 数据库中的 PR00697(*C. elegans* Sra family integral membrane protein signature, 秀丽隐杆线虫 *C. elegans* Sra 整合膜蛋白信号) 保守序列家族匹配, 8~32 肽段与 IPB001898 (sodium:sulfate symporter family, 钠:硫酸盐同向转移蛋白质家族) 匹配, 还有部分肽段分别与 IPB003804(L-lactate permease, L-乳酸盐透性酶)、PR01434 (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5 signature, NADH-辅酶 Q 氧化还原酶链 5 信号)、PR01535(vomeroneasal type 2 receptor family signature, 鼻犁骨器类型 2 受体家族信号)、IPB001421 (mitochondrial ATPase subunit 8, 线粒体 ATP 酶亚基 8)、IPB003362 (bacterial sugar transferase, 细菌糖转移酶)、PR00169 (potassium channel signature, 钾离子通道信号)、PR00701(60 kD inner membrane protein signature, 60 kD 内部膜蛋白信号) 等保守序列家族相匹配, 从这些结果可以推测 ORF9 编码的蛋白质很可能是位于病毒膜上的结构蛋白, 其功能或许与离子转运有关。可读框 ORF10 编码一个仅包含 39 个氨基酸的碱性蛋白质, 分子量为 4.3 kD。PSIBLAST 没有搜索到任何该蛋白质的同源序列。TMHMM 没有预测到跨膜螺旋的存在, 但是 TMAP 预测出 3~31 位置有一跨膜区域。BLIMPS 搜索发现该蛋白的 4~29 序列与 BLOCKS 数据库中的 IPB001010(富硫蛋白 Thionin) 相匹配, 2~25 与 6~15 序列分别与 PR01520(zeta-tubulin signature, zeta-微管蛋白信号)、IPB003606 (N-terminal to some SET domains, N-末端至 SET 结构域) 保守序列匹配。ORF14 编码一个包含 70 个氨基酸的分子量为 7.8 kD 酸性蛋白质。PSIBLAST 没有搜索到该蛋白质的任何同源序列。TMHMM 没有预测到跨膜螺旋的存在, 但是 TMAP 预测结果表明在 34~61 位置存在一

个跨膜片段. HMMPFAM 和 BLIMPS 搜索没有找到与该蛋白匹配的任何保守序列家族. 无法从以上信息推测 ORF10 和 ORF14 编码的蛋白质的功能.

2.4 SARS-CoV 蛋白质进化地位分析

我们用 PSIBLAST 程序对 SARS-CoV 的每一个蛋白质序列在非冗长蛋白质序列数据库中进行同源序列搜索, 对能搜索到同源序列的蛋白质进行进化距离分析(表 3), 并绘制无根进化树(数据未列出), 以确定 SARS-CoV 的分类地位以及与其他冠状病毒的亲缘关系.

进化树分析显示, 所有能搜索到同源序列的 SARS-CoV 蛋白质并不归属于以前划分的任何一组冠状病毒, 它们无一例外地区别于其他 3 组冠状病毒对应的蛋白而形成独立的分支, 这一结果与文献^[5,6]的报道是一致的. 同时, 进化距离矩阵计算表明, 除 PLP 和 N 蛋白质之外, SARS-CoV 的大多数蛋白质与其他每种冠状病毒对应的蛋白质在进化距离上近乎相等, 例如, SARS-3CL^{pro} 与其他冠状病毒的进化距离在 2.61~3.52 范围内变动, 平均距离为 3.09, 标准误差为 0.36; Rep 在 1.40~1.84 范围内变动, 平均距离为 1.66, 标准误差为 0.21; Hel 在 1.26~1.78 范围内变动, 平均距离为 1.52, 标准误差为 0.22 等等(表 3). 以上分析支持了文献^[5,6]的结果, 即 SARS-CoV 病毒不属于以前划分的其他 3 组冠状病毒而应该属于第 4 组. 尽管如此, 进化距离分析表明 SARS-CoV 的 Hel 和 Rep 与其他冠状病毒的对应蛋白质具有很近的亲缘关系, 它们之间的平均进化距离小于 1.7(表 3).

Hel 和 Rep 负责病毒 RNA 的复制和转录, 功能上的保守性使得它们承受较大的进化压力, 因而蛋白质的序列和结构显得更为保守. 此外, 通过比较不同冠状病毒蛋白质间的进化距离, 我们还发现一个有趣的信息, 即牛冠状病毒 BoCoV 和鼠肝炎病毒 MHV 的大部分蛋白质在亲缘关系上更靠近 SARS-CoV 冠状病毒, 例如 BoCoV 有 7 个蛋白质与 SARS-CoV 的对应蛋白质在进化距离最为接近, 它们是 PLP, NSP4, Rep, Hel, NSP11, NSP12 和 S 蛋白, MHV 有 6 个蛋白质与 SARS-CoV 的对应蛋白质在进化距离上最接近, 它们是 3CL^{pro}, HD2, GFLP, Rep, M 和 N 蛋白. 但是, 目前还没有证据表明 SARS-CoV 的蛋白质编码序列是由牛、鼠或其他物种的冠状病毒的对应序列重组而来.

3 结 论

SARS-CoV 相关蛋白质的进化树和进化距离分析表明, 该病毒是一种全新的冠状病毒, 它既不是由已知的冠状病毒重组而来, 也不是从已知的人或其他动物的冠状病毒突变而来. 我们推测其来源有两种途径: 一种可能是由未知动物冠状病毒突变或重组而来, 同时获得了感染人体细胞的能力和致病能力; 另一种可能是由未知的无毒害的人类冠状病毒突变而来, 但是没有在未被 SARS-CoV 病毒感染的人体内分离出该病毒的相关抗体^[3], 表明这种未知的“温和”病毒可能是不存在的. 建议用 SARS 病人的血清在第 1 例 SARS 病例发现地对野生和家养动物做大规模抗原-抗体反应, 以查出 SARS-CoV 的动物宿主或“源头”. 本文即将完成时, 香港大学一研究小组宣

表 3 SARS-CoV 相关蛋白质与其他冠状病毒对应蛋白质的进化距离比较^{a)}

SARS-CoV	MHV	BoCoV	PEDV	HCoV-229E	TGEV	AIBV	FIPV	PRCoV	CCoV	RSCoV	HCoV-OC43	PHEV	TuCoV	ECoV	PuV	平均进化距离	标准误差
PLP	7.22	7.09	9.26	9.49	9.86	9.84										8.79	1.29
3CL ^{pro}	2.61	2.67	2.99	3.52	3.17	3.51	3.17									3.09	0.36
HD2	5.81	6.05	6.34	7.15	6.90	8.41										6.78	0.95
NSP4	2.73	2.54	3.42	3.53	2.94	3.05										3.04	0.38
NSP5	2.56	2.64	2.59	2.22	2.50	3.09										2.60	0.28
NSP6	3.44	2.96	2.85	3.09	3.43	3.41										3.20	0.26
GFLP	2.14	2.25	2.18	2.69	2.49	2.16										2.31	0.22
Rep	1.40	1.40	1.78	1.84	1.82	1.74										1.66	0.21
Hel	1.26	1.22	1.60	1.65	1.60	1.78										1.52	0.22
NSP11	1.71	1.70	2.24	2.20	2.21	2.24										2.05	0.27
NSP12	2.53	2.49	2.81	3.16	2.99	3.32		12.18								2.88 [*]	0.34
S	5.63	5.33	8.06	6.62	7.53	7.19	7.11	7.56	7.31	5.65	5.4	5.60				6.58	0.99
M	3.35	3.37	4.59	5.13	4.90	5.85	4.93		4.93	3.54		3.36	16.43			4.40 [*]	0.91
N	4.02	4.05	7.13	6.14	6.27	5.71	6.14		6.18	4.07	4.13	4.08	5.69	4.03	4.08	5.12	1.44

a) MHV——鼠肝炎病毒, BoCoV——牛冠状病毒, PEDV——猪流行性痢疾病毒, HCoV-229E——人冠状病毒 229E, TGEV——传染性肠胃炎病毒, AIBV——禽传染性支气管炎病毒, FIPV——猫传染性腹膜炎病毒, PRCoV——猪呼吸道冠状病毒, CCoV——犬冠状病毒, RSCoV——鼠唾液腺冠状病毒, HCoV-OC43——人冠状病毒 OC43, PHEV——猪血球凝集脑脊髓炎病毒, TuCoV——火鸡冠状病毒, ECov——马冠状病毒, PuV——海鸟病毒

布他们在深圳一家市场的 6 只果子狸体内分离出了类似于 SARS-CoV 的冠状病毒, 同时, 该市场 10 名与果子狸长期接触的人员当中有 5 人体内分离出了 SARS 病毒抗体^[27], 但是, 果子狸的冠状病毒是如何获得感染人体细胞能力的? 突变还是重组? 果子狸冠状病毒演变成 SARS-CoV 后是否还具有感染果子狸的能力? 是否会导致果子狸的下呼吸道感染? 是否还存在 SARS-CoV 的其他动物宿主? 这些问题的解决对于能否彻底消灭 SARS 是至关重要的。

我们对 SARS-CoV 所有蛋白质的分子量、等电点、分子消光系数的预测对于这些蛋白质的分离、提取和纯化提供了有用的信息, 同时, 蛋白质的跨膜区预测、保守序列家族搜索以及同源序列比对对于预测功能未知蛋白的功能提供了有用的信息。我们的分析结果表明, ORF1ab 编码的蛋白质产物主要与多蛋白质体的剪切和病毒 RNA 的复制与转录有关; X1 蛋白具有跨膜螺旋结构的同时还具有与膜蛋白 S_{rb} 信号保守序列家族相似的氨基酸序列, 表明 X1 可能是存在于 SARS-CoV 蛋白质外壳上的结构蛋白; X2 蛋白不具有跨膜结构, 但是有一段双向核定位信号序列, 同时它为强碱性蛋白, 表明 X2 很可能与 RNA 结合, 对病毒包装起作用; S 蛋白的二级结构特征和亲疏水性特征能够很好地支持冠状病毒的坍塌感染模型, 同时, 我们对 S 蛋白的生物信息学分析为寻找针对 S 蛋白的抗原位点提供了信息。我们的工作为理论构建 SARS-CoV 相关蛋白质的结构以及实验测定 SARS-CoV 蛋白质组奠定了基础, 从长远的观点看, 还为抗 SARS 药物设计以及 SARS 疫苗研制提供了一些有用的信息。

参 考 文 献

- 1 Peiris J S M, Lai S T, Poon L L M. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2003, 361: 1319~1325
- 2 Drosten C, Günther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, 348: 1967~1976
- 3 Ksiazek T G, Erdman D, Goldsmith C S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, 348: 1947~1958
- 4 秦鄂德, 祝庆余, 于曼, 等. SARS 相关病毒(BJ01 株)的全序列及其比较分析. *科学通报*, 2003, 48(11): 1127~1134
- 5 Rota P A, Oberste M S, Monroe S S, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*, 2003, 300:1394~1399
- 6 Marra M A, Jones S J, Astell C R, et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*, 2003, 300: 1399~1404
- 7 Jun R Y, Lin W C, Ling A E, et al. Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. *Lancet*, 2003, 361: 1779~1790
- 8 Gallagher T M, Buchmeier M J. Coronavirus spike protein in viral entry and pathogenesis. *Virology*, 2001, 279: 371~374
- 9 Bonavia A, Zelus B D, Wentworth D E, et al. Identification of a receptor binding domain of the spike glycoprotein of human coronavirus HCoV-229E. *J Virol*, 2003, 77: 2530~2538
- 10 Garoff H, Hewson R, Opstelten D J. Virus maturation by budding. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62: 1171~1190
- 11 Boeckmann B, Bairoch A, Apweiler R, et al. The Swiss-Prot protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 365~370
- 12 Herold J, Raabe T, Schelle-Prinz B, et al. Nucleotide sequence of the human coronavirus 229E RNA polymerase locus. *Virology*, 1993, 195: 680~691
- 13 Brendel V, Bucher P, Nourbakhsh I, et al. Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 2002~2006
- 14 Subramaniam S. The Biology workbench—A seamless database and analysis environment for the biologist [editorial]. *Proteins*, 1998, 32: 1~2
- 15 Persson B, Argos P. Prediction of transmembrane segments in proteins utilising multiple sequence alignments. *J Mol Biol*, 1994, 237: 182~192
- 16 Sonnhammer E L, Heijne G Von, Krogh A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 1998, 6: 175~182
- 17 Bateman A, Birney E, Cerruti L, et al. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 276~280
- 18 Wallace J C, Henikoff S. PATMAT: A searching and extraction program for sequence, pattern and block queries and databases. *Comput Appl Biosci*, 1992, 8: 249~254
- 19 Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 3389~3402
- 20 Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22: 4673~4680
- 21 Felsenstein J. PHYLIP—Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, 1989, 5: 164~166
- 22 Saraste M, Sibbald P R, Wittinghofer A. The P-loop—a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci*, 1990, 15: 430~434
- 23 Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol*, 1982, 157: 105~132
- 24 Bonavia A, Zelus B D, Wentworth D E, et al. Identification of a receptor-binding domain of the spike glycoprotein of human coronavirus HCoV-229E. *J Virol*, 2003, 77: 2530~2538
- 25 Ortego J, Escors D, Laude H, et al. Generation of a replication-competent, propagation-deficient virus vector based on the transmissible gastroenteritis coronavirus genome. *J Virol*, 2002, 76: 11518~11529
- 26 Kuo L, Masters P S. The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. *J Virol*, 2003, 77: 4597~4608
- 27 Cyranoskiand D, Abbott A. Virus detectives seek source of SARS in China's wild animals. *Nature*, 2003, 423: 467

(2003-06-03 收稿, 2003-06-26 收修改稿)