

• 新型冠状病毒肺炎 •

刺突蛋白与新型冠状病毒的检测和治疗

陈咏竹¹, 邱峰²

1. 四川大学华西医院 期刊社(成都 610041)

2. 四川大学华西医院 转化神经科学中心 麻醉与危重急救研究室(成都 610041)

【摘要】 最近,一种由新型冠状病毒 2019-nCoV 引起的 COVID-19 肺炎疫情在全球暴发。为了更好地控制疫情的蔓延,亟需对 2019-nCoV 的来源、传播和致病机制进行深入研究。刺突(spike)蛋白是冠状病毒表面特有的结构蛋白,包含了冠状病毒自然演化的重要信息,并在病毒识别和入侵人体细胞的过程中起到关键作用。最近十几年,在对与人类密切相关的冠状病毒的研究中,spike 蛋白一直是最为重要的研究对象之一。而在 COVID-19 肺炎疫情暴发后,2019-nCoV 病毒表面的 spike 蛋白也迅速成为研究的焦点。本文旨在通过介绍 spike 蛋白相关研究,以期当前疫情的防控以及 COVID-19 的诊断和治疗提供合理的研究思路。

【关键词】 冠状病毒; 刺突蛋白; 抗体; 疫苗

Spike protein in the detection and treatment of novel coronavirus

CHEN Yongzhu¹, QIU Feng²

1. Periodical Press of West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, P.R.China

2. Laboratory of Anesthesia and Critical Care Medicine, Translational Neuroscience Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, P.R.China

Corresponding author: QIU Feng, Email: fengqiu@scu.edu.cn

【Abstract】 Recently a COVID-19 pneumonia pandemic caused by a novel coronavirus 2019-nCoV has broken out over the world. In order to better control the spread of the pandemic, there's an urgent need to extensively study the virus' origin and the mechanisms for its infectivity and pathogenicity. Spike protein is a special structural protein on the surface of coronavirus. It contains important information about the evolution of the virus and plays critical roles in the processes of cellular recognition and entry. In the past decades, spike protein has always been one of the most important objects in research works on coronaviruses closely related to human life. In this review we introduce these research works related to spike proteins, hoping it will provide reasonable ideas for the control of the current pandemic, as well as for the diagnosis and treatment of COVID-19.

【Key words】 coronavirus; spike protein; antibody; vaccine

引言

2019 年 12 月底,中国武汉出现了新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的传染病疫情。我国医疗和科研工作者迅速作出响应,很快鉴定出该传染病是由一种新型冠状病毒(暂命名为 2019-nCoV 或 SARS-CoV-2)对肺部的感染引起的。和 2002 年出现于香港的非典病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)、2012 年出现于沙特的中东热病毒(Middle East respiratory syndrome

coronavirus, MERS-CoV)一样,2019-nCoV 属于套式病毒目、冠状病毒科、冠状病毒属,是目前已知的第七种感染人类的冠状病毒。由于这是一种全新的病毒,人们对于其来源和传播方式、致病的机制和临床表现不够了解,加上其具有较强的传染性,使得疫情在暴发后迅速蔓延至世界各地。目前除了中国以外,在亚洲的韩国、日本和伊朗,欧洲的意大利、法国、德国和西班牙,以及北美洲的美国,均已出现较为严重的疫情。

随着我国疫情防控工作的积极展开,越来越多

DOI: 10.7507/1001-5515.202002050

基金项目:四川大学华西医院新型冠状病毒肺炎疫情科技攻关项目(HX2019nCoV005);国家自然科学基金(31100565)

通信作者:邱峰,Email:fengqiu@scu.edu.cn



的患者得到诊治, COVID-19 的流行病学特征已得到全面的了解, 疫情在我国也逐渐得到了控制^[1]。但是, 疫情在全球范围内的流行形势仍然严峻。此外, 2019-nCoV 的来源是什么、为什么它具有如此强的传播能力以及如何用药物有效地预防和治疗 COVID-19 等诸多问题, 仍然亟待解答。想要回答这些问题, 就必须从 2019-nCoV 本身入手进行深入的研究。

作为一种冠状病毒, 2019-nCoV 表面的刺突 (spike, S) 蛋白是一种非常重要的标志性蛋白。以往研究表明, 一个冠状病毒的 S 蛋白, 往往包含了该病毒的来源、致病性、致病机制和治疗方法等潜在信息, 是冠状病毒研究中的重要对象。本文将对冠状病毒鉴定、诊断和治疗中与 S 蛋白相关的研究进展进行综述, 为在今后针对 2019-nCoV 的 S 蛋白开展相关研究提供思路。

1 冠状病毒 S 蛋白

成熟的冠状病毒有 4 种结构蛋白, 由内向外, 包括结合基因组 RNA 形成核衣壳的核 (nucleocapsid, N) 蛋白、参与包膜形成的小包膜 (envelop, E) 蛋白、包膜 (membrane, M) 蛋白以及位于包膜表面形成刺状突起的 S 蛋白。S 蛋白是一种糖蛋白, 一般由 1 160 ~ 1 400 个氨基酸残基组成, 并含有多个 N-糖基化位点, 是介导冠状病毒识别、侵染宿主细胞的重要元件。

由冠状病毒基因组 RNA 编码的 S 蛋白, 通常在病毒组装过程中被剪切为球状的 S1 亚基和棒状的 S2 亚基。其中 S1 亚基暴露于包膜表面, 是识别、结合宿主细胞表面受体的重要部位; S2 亚基嵌于包膜内, 是介导病毒包膜与宿主细胞膜融合、实现病毒入侵的关键结构。以 SARS-CoV 为例, S1 亚基中的受体结合域 (receptor binding domain, RBD) 与宿主细胞表面受体血管紧张素转化酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 结合, 同时引起包膜内 S2 亚基结构改变, 暴露出 S2 亚基中的融合肽段 (fusion peptide, FP), 使其能够插入宿主细胞的细胞膜内^[2]。鉴于上述功能, S 蛋白决定了冠状病毒的宿主、组织嗜性及其侵染、致病的能力, 因此也成为鉴定冠状病毒种属以及诊断、治疗冠状病毒感染的重要靶点。

2 S 蛋白与冠状病毒的鉴定

2.1 S 蛋白决定冠状病毒形态

病毒颗粒的显微形态, 是对未知病毒进行鉴

定、分类的最重要的标准之一。冠状病毒是具包膜的正链单股 RNA 病毒, 直径约为 80 ~ 120 nm。在成熟冠状病毒的表面, S 蛋白以三聚体的形式形成花冠状结构, 是冠状病毒区别于其他病毒的重要形态特征, 冠状病毒也由此而得名。因此, 由 S 蛋白在病毒表面形成的花冠状结构的存在, 是从形态学上鉴定冠状病毒的金标准之一。例如, COVID-19 疫情暴发后, 国家病原微生物资源库于 2020 年 1 月 24 日发布的第一株 2019-nCoV 病毒毒种信息中, 就包含了其花冠状结构清晰可见的透射电子显微镜图像, 以此为鉴定依据, 将其归属为冠状病毒 β 属。同样, 相继在其他国家被鉴定出来的 2019-nCoV 病毒, 也是以 S 蛋白形成的花冠状结构为典型标志^[3]。

2.2 S 蛋白的序列分析

除了在形态学上决定冠状病毒的分类学归属外, S 蛋白也是病毒在演化过程中最容易发生变异的区域。在 S 蛋白序列中发生的变异, 决定了一个新的冠状病毒与其他同属病毒的区别, 同时也可能包含了其演化来源的潜在信息, 对于未知病毒的鉴定有着重要的意义。因此, 对于刚刚出现的 2019-nCoV 病毒, 研究者在用生物信息学手段对其基因组进行分析的时候, 也都把 S 蛋白的序列分析作为研究的重点。例如, Xu 等^[4]将 2019-nCoV 与 SARS-CoV 的序列进行比对, 发现二者有较高的同源性, 而 2019-nCoV 中发生变异的区域主要集中在 S 蛋白。通过对 S 蛋白进行建模, 推测出 2019-nCoV 具有较高的在人群中传播的风险。Li 等^[5]通过全基因组序列的比对, 尤其是 S 蛋白基因的比对, 发现与两种来源于穿山甲的冠状病毒相比, 一种来源于蝙蝠的冠状病毒与 2019-nCoV 在进化史上更为接近, 从而判断蝙蝠更有可能是 2019-nCoV 向人类传播的中间宿主。而 Ji 等^[6]通过对 S 蛋白的基因序列进行分析, 发现 2019-nCoV 似乎是来源于蝙蝠冠状病毒与未知冠状病毒在 S 蛋白上的同源重组。基于相对同义密码子使用偏好, 他们推测 S 蛋白上发生的这些重组可能促进了病毒由蛇向人的传播。这些针对 S 蛋白的序列分析, 为鉴定 2019-nCoV 的来源、推测其致病性提供了重要线索。

2.3 S 蛋白的三维结构

众所周知, 蛋白质的功能最终取决于其三维空间结构。对于新出现的 2019-nCoV, 快速解析其各种重要结构蛋白的三维结构, 能够为研究其侵染人体细胞的机制提供关键的线索。最近 Wrapp 等^[7]报道了 2019-nCoV 病毒的 S 蛋白的首个冷冻电镜

结构, 基于该结构, 他们发现 2019-nCoV 的 S 蛋白与受体 ACE2 的结合能力比 SARS-CoV 更强, 这或许解释了为什么 2019-nCoV 具有比 SARS-CoV 更强的传播能力。因此, 在后续的研究中, 利用蛋白质晶体学、冷冻电镜等方法研究 S 蛋白的精细三维结构, 尤其是在其与宿主细胞表面受体结合过程中的结构变化, 将是非常重要的研究方向。

3 S 蛋白与冠状病毒的诊断

3.1 基于核酸聚合酶链式反应检测的诊断

2019-nCoV 病毒感染人体后, 虽然通常会导致发热、咳嗽、肺部炎症等临床症状, 但在不同个体中表现出较大的症状差异, 甚至有许多被感染者在早期无任何临床症状。因此, 在 2019-nCoV 的诊断中, 针对病毒核酸分子的各种聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测方法仍然是应用最为广泛的分子诊断方法。对于新出现的 2019-nCoV, 目前已有相应的 PCR 检测技术用于临床诊断^[8-9]。但是 PCR 检测涉及 RNA 提取、保存等复杂的技术, 更需要依赖先进的 PCR 设备和昂贵的试剂, 时间、人力和经济成本都非常高, 难以满足疫情迅速暴发时庞大的检测量需求。同时由于不能做到即时检测, RNA 样品在保存、运输过程中的降解和污染也会造成漏检或假阳性。为了弥补核酸 PCR 检测的不足, 基于蛋白质抗原-抗体反应的检测技术也逐渐受到重视。

3.2 基于 S 蛋白的酶联免疫吸附试验

酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immune sorbent assay, ELISA) 能够基于特异性的抗原-抗体反应, 快速、简便地进行病原体检测, 具有特异性强、敏感性高的优点, 被广泛应用于许多疾病的诊断。对于冠状病毒来说, S 蛋白在很大程度上决定了其种属特异性, 因此也是冠状病毒表面最为重要的抗原决定簇。近年来, 针对各种冠状病毒表面 S 蛋白抗原, 研究者们开发了许多用于快速检测、诊断冠状病毒感染的方法。例如, Sunwoo 等^[10]针对 SARS-CoV 表面的 S1 抗原开发了一种双特异性单克隆抗体, 可用于临床上对疑似非典患者的诊断。

此外, 由于 S 蛋白作为抗原能够诱导宿主体内产生特异性的抗体, 这些特异性的抗体也可作为诊断冠状病毒感染的靶分子, 直接从血清样品中进行检测。例如, 为了检测针对猪 δ 冠状病毒 (porcine deltacoronavirus, PDCoV) 的特异性 IgG 抗体, Thachil 等^[11]以 PDCoV 的 S 蛋白的 S1 亚基为包被

抗原, 建立了间接 ELISA 法, 敏感性达到 91%, 特异性达到 95%。Zhao 等^[12]针对抗马冠状病毒 S1 亚基的抗体建立了一套 ELISA 检测方法, 能够有效诊断马冠状病毒感染。

这些研究证实了基于 S 蛋白抗原-抗体反应的 ELISA 检测在冠状病毒诊断中的有效性。相比于基于核酸的 PCR 检测技术, ELISA 检测更加快速简便, 并且能够即时、直接地对血清样品进行检测, 具有独特的优势。因此, 在当前疫情的防控中, 针对 2019-nCoV 的 S 蛋白开发有效的 ELISA 检测试剂盒将是一个非常重要的方向。

4 S 蛋白与冠状病毒的治疗

对于感染人类的 SARS-CoV、MERS-CoV 以及当前暴发的 2019-nCoV 等病毒, 目前尚无特效药物上市, 临床治疗基本以支持治疗、辅助药物治疗为主。而目前在研的药物主要分为三大类, 第一类是抑制病毒复制、组装以及与宿主细胞融合等过程的抗病毒药物, 第二类是针对病毒表面蛋白的抗体药物, 第三类是基于病毒表面蛋白的疫苗。

4.1 抑制 S 蛋白裂解的抗病毒药物

抗病毒药物通常是通过抑制病毒复制、组装及与宿主细胞融合过程中所需的酶来达到抑制病毒的目的。由冠状病毒基因组 RNA 表达的 S 蛋白, 需要在宿主细胞内被蛋白酶裂解为 S1 和 S2 两个亚基, 这一过程通常发生在病毒组装或其与宿主细胞融合的过程中。因此对 S 蛋白裂解所需的相关蛋白酶进行抑制, 就能有效抑制冠状病毒的增殖或侵染。目前, 用于抑制 S 蛋白裂解的药物有抑制跨膜蛋白酶丝氨酸 2 (transmembrane protease serine 2, TMPRSS2) 活性的卡莫司他 (Camostat) 和奈莫司他 (Nafamostat) 以及抑制组织蛋白酶 L (Cathepsin L) 活性的替考拉宁 (Teicoplanin) 等^[13-15]。此外, 最近有研究发现, 2019-nCoV 的 S 蛋白中含有独特的弗林蛋白酶 (Furin) 切割位点, 提示可针对 Furin 这一潜在的靶点, 开发相应的抑制剂来治疗 2019-nCoV 感染^[16]。

4.2 基于 S 蛋白的抗体和疫苗

S 蛋白与宿主细胞表面蛋白的识别与结合, 是冠状病毒入侵细胞的重要步骤, 因此 S 蛋白或其相应的细胞表面受体, 也常被作为靶点来制备抗体药物。S1 亚基中的 RBD 和 S2 亚基中的七肽重复区 (heptad repeat, HR) 是最常用的两个抗体药物靶点。此外, 表达于宿主细胞表面的二肽基肽酶 4 (dipeptidyl peptidase 4, DPP4) 通过 RBD 与 S 蛋白

结合,从而介导病毒的入侵,因此也是潜在的抗体药物靶点。据统计,目前有10余种以S蛋白或其细胞表面受体为靶点的抗体药物已进入临床前动物实验阶段^[17]。

另一方面,利用S蛋白作为抗原制备冠状病毒疫苗也是当前的热点研究领域。Rodon等^[18]用重组S蛋白免疫美洲驼,成功地阻断了MERS-CoV在动物中的传播。Ababneh等^[19]制备了编码S1亚基的腺病毒疫苗,在小鼠实验中获得了理想的体液和细胞免疫反应。这些研究提示,基于S蛋白研发冠状病毒疫苗,将是当前2019-nCoV和未来其他新型冠状病毒疫情防控的重要策略。

5 S蛋白中的短肽片段

随着蛋白质生物化学与分子生物学的不断发展,人们逐渐认识到对于一个蛋白质的结构与功能来说,蛋白质序列中一些关键的短肽片段往往起着决定性的作用。同样,在作为冠状病毒检测和治疗靶点的S蛋白中,也有这样一些关键的短肽片段。基于这些关键的短肽片段来模拟或调控整个S蛋白质的结构和功能,已成为目前冠状病毒防治中一个重要的研究方向。

5.1 S蛋白中的抗原表位短肽

抗原表位(epitope)是近年来在分子免疫学领域新兴的一个概念,即在一个作为抗原的蛋白质中,有一些特殊的短肽序列,是该抗原蛋白与特定的抗体结合或被人体免疫细胞识别的关键片段,这些关键短肽片段被称为抗原表位。对抗原表位进行研究,能够帮助人们更好地了解一个抗原蛋白的免疫应答和致病机制。而由于S蛋白是冠状病毒表面最为重要的抗原决定簇,对其抗原表位短肽片段的研究尤为重要。吴瑞平等^[20]利用噬菌体展示技术构建了SARS-CoV病毒S蛋白的抗原库,并分析了其中潜在的抗原表位片段,为预防性疫苗和药物的开发奠定了基础。此外,在MERS-CoV病毒的S蛋白中,也有许多重要的抗原表位片段被鉴定出来^[21-23]。

另一方面,利用抗原表位短肽片段来设计疫苗,能够在避免完整病毒株毒性的同时,直接、准确地获得特异性的免疫保护,因此也是当前病毒疫苗研究中的热点。例如,针对前几年暴发的SARS-CoV和MERS-CoV病毒,已有许多基于抗原表位片段的多肽疫苗被报道^[24-25]。这些研究提示,基于S蛋白抗原表位的多肽疫苗,是未来新型冠状病毒防治的重要策略。而就在最近,Baruah等^[26]用免

疫信息学的方法从2019-nCoV的S蛋白中鉴定出5个细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)抗原表位和8个B细胞抗原表位。模拟观察发现,鉴定出的CTL抗原表位能够与I类主要组织相容性复合体结合,表明它们具有产生免疫反应的潜力,为进一步开发2019-nCoV多肽疫苗提供了潜在候选短肽片段。

5.2 S蛋白中的自识别短肽片段

在自然界中,一些以寡聚体或多聚体形式存在的蛋白质,往往是通过蛋白序列中一些能够自我识别、结合的短肽片段来聚合的,这些短肽被称为自识别短肽(self-binding peptide, SBP)。典型的SBP包括以螺旋形式存在的亮氨酸/异亮氨酸拉链^[27]、以 β -折叠形式存在的 β -拉链^[28],以及主要由芳香族氨基酸组成的芳香拉链^[29]。人工合成的这些SBP片段,能够对完整蛋白质中相应的SBP片段进行识别和结合,因此可以作为探测相应蛋白质的工具或阻断其功能的药物。

在冠状病毒S蛋白S2亚基的HR区,含有典型的亮氨酸/异亮氨酸拉链形式的SBP片段。这些片段的自我识别在S蛋白三聚体的形成以及病毒入侵宿主细胞膜的过程中都具有重要的作用。例如,研究者们从SARS-CoV的S2亚基的HR区中分离出一些SBP片段,这些片段能够特异性地与S2亚基结合,从而阻断SARS-CoV病毒包膜与宿主细胞膜的融合,使病毒不能进入细胞,因此是很有潜力的病毒抑制剂^[30-31]。此外,Zhang等^[32]从SARS-CoV的S1亚基中也鉴定出一系列主要以 β -拉链形式存在的SBP片段。这些片段能够特异性地识别、结合真核细胞表达的S蛋白,有望被开发成为快速鉴定、检测SARS-CoV病毒的新型试剂。

6 展望

总结以往对于SARS-CoV和MERS-CoV等感染人类的冠状病毒的研究,以及当前对于新型2019-nCoV病毒的研究,不难发现S蛋白是冠状病毒中最值得研究的一个重要蛋白。通过生物信息学、蛋白质分子模拟、高分辨率冷冻电镜及蛋白质晶体学等技术,能够揭示S蛋白的演化起源、三维结构及其变化、受体识别结合能力等重要信息,从而鉴定2019-nCoV病毒的来源,分析其致病性和传播机制。而基于现代药物化学、免疫学、基因工程等技术,可以针对S蛋白开发2019-nCoV病毒的诊断和治疗方法。不难预见,在当前COVID-19防控相关的基础研究工作中,以及对于今后可能出现的

新型冠状病毒的研究中, S 蛋白将仍然是值得重点关注的研究对象。

利益冲突声明: 本文全体作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- 1 中国疾病预防控制中心新型冠状病毒肺炎应急响应机制流行病学组. 新型冠状病毒肺炎流行病学特征分析. 中华流行病学杂志, 2020, 41(02): 145-151. doi: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2020.02.003.
- 2 Bosch B J, van der Zee R, de Haan C A M, *et al.* The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol*, 2003, 77(16): 8801-8811. doi: 10.1128/JVI.77.16.8801-8811.2003.
- 3 Park W B, Kwon N J, Choi S J, *et al.* Virus isolation from the first patient with SARS-CoV-2 in Korea. *J Korean Med Sci*, 2020, 35(7): e84. doi: 10.3346/jkms.2020.35.e84.
- 4 Xu X, Chen P, Wang J, *et al.* Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci China Life Sci*, 2020. doi: 10.1007/s11427-020-1637-5.
- 5 Li Xingguang, Zai Junjie, Zhao Qiang, *et al.* Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2. *J Med Virol*, 2020. doi: 10.1002/jmv.25731.
- 6 Ji Wei, Wang Wei, Zhao Xiaofang, *et al.* Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV. *J Med Virol*, 2020, 92(4): 433-440. doi: 10.1002/jmv.25682.
- 7 Wrapp D, Wang N, Corbett K S, *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 2020: eabb2507.
- 8 Corman V M, Landt O, Kaiser M, *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*, 2020, 25(3). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
- 9 Chu D K W, Pan Yang, Cheng S M S, *et al.* Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia. *Clin Chem*, 2020. doi: 10.1093/clinchem/hvaa02s9.
- 10 Sunwoo H H, Palaniyappan A, Ganguly A, *et al.* Quantitative and sensitive detection of the SARS-CoV spike protein using bispecific monoclonal antibody-based enzyme-linked immunoassay. *J Virol Methods*, 2013, 187(1): 72-78. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.09.006.
- 11 Thachil A, Gerber P F, Xiao C T, *et al.* Development and application of an ELISA for the detection of porcine deltacoronavirus IgG antibodies. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124363. doi: 10.1371/journal.pone.0124363.
- 12 Zhao Shan, Smits C, Schuurman N, *et al.* Development and validation of a S1 protein-based ELISA for the specific detection of antibodies against equine coronavirus. *Viruses*, 2019, 11(12). doi: 10.3390/v11121109.
- 13 Zhou Y, Vedantham P, Lu K, *et al.* Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. *Antiviral Res*, 2015, 116: 76-84. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.01.011.
- 14 Yamamoto M, Matsuyama S, Li X, *et al.* Identification of nafamostat as a potent inhibitor of Middle East respiratory syndrome coronavirus S protein-mediated membrane fusion using the split-protein-based cell-cell fusion assay. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60: 6532-6539. doi: 10.1128/AAC.01043-16.
- 15 Zhou N, Pan T, Zhang J, *et al.* Glycopeptide antibiotics potently inhibit cathepsin L in the late endosome/lysosome and block the entry of Ebola virus, Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), and severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV). *J Biol Chem*, 2016, 291: 9218-9232. doi: 10.1074/jbc.M116.716100.
- 16 Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, *et al.* The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res*, 2020, 176: 104742. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104742.
- 17 Rabaan A A, Alahmed S H, Bazzi A M, *et al.* A review of candidate therapies for Middle East respiratory syndrome from a molecular perspective. *J Med Microbiol*, 2017, 66(9): 1261-1274. doi: 10.1099/jmm.0.000565.
- 18 Rodon J, Okba N M A, Te N, *et al.* Blocking transmission of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in llamas by vaccination with a recombinant spike protein. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8(1): 1593-1603. doi: 10.1080/22221751.2019.1685912.
- 19 Ababneh M, Alrwashdeh M, Khalifeh M. Recombinant adenoviral vaccine encoding the spike 1 subunit of the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus elicits strong humoral and cellular immune responses in mice. *Vet World*, 2019, 12(10): 1554-1562. doi: 10.14202/vetworld.2019.1554-1562.
- 20 吴瑞平, 孟佳子, 何玉先. SARS 冠状病毒 S 蛋白噬菌体抗原库的构建及筛选. *病毒学报*, 2013, 3: 280-286.
- 21 Wang N, Rosen O, Wang L, *et al.* Structural definition of a neutralization-sensitive epitope on the MERS-CoV S1-NTD. *Cell Rep*, 2019, 28(13): 3395-3405. doi: 10.1016/j.celrep.2019.08.052.
- 22 Zhou H, Chen Y, Zhang S, *et al.* Structural definition of a neutralization epitope on the N-terminal domain of MERS-CoV spike glycoprotein. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3068. doi: 10.1038/s41467-019-10897-4.
- 23 Zhang S, Zhou P, Wang P, *et al.* Structural definition of a unique neutralization epitope on the receptor-binding domain of MERS-CoV spike glycoprotein. *Cell Rep*, 2018, 24(2): 441-452. doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.041.
- 24 Wang Q, Zhang L, Kuwahara K, *et al.* Immunodominant SARS coronavirus epitopes in humans elicited both enhancing and neutralizing effects on infection in non-human primates. *ACS Infect Dis*, 2016, 2(5): 361-376. doi: 10.1021/acsinfecdis.6b00006.
- 25 Tahir Ul Qamar M, Saleem S, Ashfaq U A, *et al.* Epitope-based peptide vaccine design and target site depiction against Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: an immune-informatics study. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 362. doi: 10.1186/s12967-019-2116-8.
- 26 Baruah V, Bose S. Immunoinformatics-aided identification of T cell and B cell epitopes in the surface glycoprotein of 2019-nCoV. *J Med Virol*, 2020. doi: 10.1002/jmv.25698.
- 27 Bourbigot S, Beltz H, Denis J, *et al.* The C-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr adopts an antiparallel dimeric structure in solution via its leucine-zipper-like domain. *Biochem J*, 2005, 387(Pt 2): 333-341.
- 28 Sawaya M R, Sambashivan S, Nelson R, *et al.* Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature*, 2007, 447(7143): 453-457. doi: 10.1038/nature05695.
- 29 Cochran A G, Skelton N J, Starovasnik M A. Tryptophan zippers: stable, monomeric beta-hairpins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(10): 5578-5583. doi: 10.1073/pnas.091100898.

(下转第261页; Continued on Page 261)

