

# SARS-CoV-2主蛋白酶的表达、纯化和一种新型晶体结构的研究

刘雪静<sup>1,2</sup>, 赵文聪<sup>2</sup>, 高欣欣<sup>2</sup>, 陈思旭<sup>2</sup>, 张博涛<sup>2</sup>, 王君帅<sup>2</sup>, 李朝阳<sup>2</sup>, 温一帆<sup>2</sup>, 高靓<sup>2\*</sup>,  
曹鹏<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>北京工业大学材料科学与工程学院, 北京

<sup>2</sup>北京工业大学化学与生命科学学院, 北京

收稿日期: 2024年3月12日; 录用日期: 2024年4月11日; 发布日期: 2024年4月22日

## 摘要

新型冠状病毒SARS-CoV-2的主蛋白酶(Main Protease, M<sup>pro</sup>), 也称为3-糜蛋白酶样蛋白酶(3CL<sup>pro</sup>), 在病毒复制的过程中发挥核心作用。M<sup>pro</sup>的结构和功能在 $\beta$ -冠状病毒中相对保守, 在人体内没有同源蛋白, 因此是抗病毒药物开发的关键靶点。本研究完成了SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup>的原核表达与纯化, 获得具有高纯度和高均一性的蛋白质样品。利用气相扩散坐滴法开展了M<sup>pro</sup>的结晶筛选, 获得单晶体后将其浸泡在由谷胱甘肽包裹的金团簇纳米材料溶液中, 成功解析了仅有第156位半胱氨酸结合一个金离子的一个新型X射线衍射晶体结构。结构分析发现, M<sup>pro</sup>蛋白的Cys156结合金离子后Asp153~Cys156区域的构象发生了~0.6 Å的偏移, 推测该构象变化进一步通过变构效应抑制M<sup>pro</sup>的生物功能, 为新冠病毒的纳米型抑制剂的研发提供了新的信息。

## 关键词

SARS-CoV-2, M<sup>pro</sup>, 金团簇, 蛋白质表达与纯化, X射线晶体结构

## Expression and Purification of SARS-CoV-2 Main Protease and Study of Novel Crystal Structure

Xuejing Liu<sup>1,2</sup>, Wencong Zhao<sup>2</sup>, Xinxin Gao<sup>2</sup>, Sixu Chen<sup>2</sup>, Botao Zhang<sup>2</sup>, Junshuai Wang<sup>2</sup>,  
Chaoyang Li<sup>2</sup>, Yifan Wen<sup>2</sup>, Liang Gao<sup>2\*</sup>, Peng Cao<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Materials Science and Engineering, Beijing University of Technology, Beijing

<sup>2</sup>College of Chemistry and Life Sciences, Beijing University of Technology, Beijing

\*通讯作者。

文章引用: 刘雪静, 赵文聪, 高欣欣, 陈思旭, 张博涛, 王君帅, 李朝阳, 温一帆, 高靓, 曹鹏. SARS-CoV-2 主蛋白酶的  
表达、纯化和一种新型晶体结构的研究[J]. 生物医学, 2024, 14(2): 229-239. DOI: 10.12677/hjbm.2024.142025

## Abstract

The main protease ( $M^{pro}$ ) of the novel coronavirus SARS-CoV-2, also known as 3C-like protease (3CLpro), plays a central role in the virus replication process. The structure and function of  $M^{pro}$  are relatively conserved in  $\beta$ -coronaviruses and there is no homologous protein in human, making it a key target for antiviral drug development. In this study, we successfully completed the prokaryotic expression and purification of SARS-CoV-2  $M^{pro}$ , obtaining a high-purity and high-homogeneity protein sample. Crystallization screening of  $M^{pro}$  was carried out using the vapor-diffusion sitting-drop method. After obtaining single crystals, they were soaked in a solution of the nano-material glutathione-protected Au clusters, resulting in a novel X-ray diffraction crystal structure with only one cysteine at position 156 binding to one Au(I) ion. Structural analysis revealed a  $\sim 0.6$  Å displacement in the conformation of the Asp153~Cys156 region of the  $M^{pro}$  protein upon binding of the Cys156 to the gold ion, suggesting that this conformational change further inhibits the biological function of  $M^{pro}$  through an allosteric effect, providing new information for the development of novel coronavirus inhibitors.

## Keywords

SARS-CoV-2,  $M^{pro}$ , Gold Cluster, Protein Expression and Purification, X-ray Crystal Structure

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

新型冠状病毒于 2019 年 12 月首次被发现，国际病毒分类委员会将其命名为 SARS-CoV-2，基因组与之前已知的 SARS-CoV 相似度 $\sim 82\%$  [1]。该病毒感染人体后会引发急性呼吸窘迫综合征、心脏病、多器官衰竭等多种致命性疾病[2]。SARS-CoV-2 是一种包膜、单链 RNA 病毒，属于冠状病毒科[1] [3]。冠状病毒可分为四组，分别用希腊字母  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  和  $\delta$  表示[4]。除新出现的 SARS-CoV-2 外，目前有 7 种冠状病毒能够感染人类，其中 HCoV-NL63 和 HCoV-229E 属于  $\alpha$  型冠状病毒，HCoV-HKU1、HCoV-OC43、SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 属于  $\beta$  型冠状病毒[5]。与其他人类冠状病毒类似，SARS-CoV-2 的基因组有两个开放阅读框，编码两个长链多肽，即 pp1a 和 pp1ab [6] [7]。长链多肽被两个半胱氨酸蛋白酶消化成 16 个成熟的非结构蛋白(Nsp1-16)，它们分别是 Nsp5 编码的主蛋白酶(Main protease,  $M^{pro}$ )和 Nsp3 编码的类木瓜蛋白酶(Papain-like protease, PLpro) [8]。 $M^{pro}$  的催化导致功能性 Nsp4-16 的释放，而 PLpro 的催化导致 Nsp1-3 的成熟[9] [10]。

$M^{pro}$  又名 3-糜蛋白酶样蛋白酶(3CLpro)，在多种冠状病毒中具有较高的保守性，以其作为治疗靶点可有效绕过病毒突变体的免疫逃逸机制。 $M^{pro}$  在人体内没有同源物，将其作为治疗靶点对人体的危害性低，副作用较小[11]。 $M^{pro}$  是一种半胱氨酸蛋白酶，识别序列为 L-Q↓(S, A, G) (↓为裂解位点)，对冠状病毒的复制不可或缺[12] [13] [14]。X 射线晶体结构研究发现  $M^{pro}$  作为一种稳定的同型二聚体才具有催化

活性, 两个单体呈直角结合形成心形复合物[15]。每个单体含有三个结构域, N 端结构域 I (残基 10-99) 和结构域 II (残基 100-182) 折叠成 6 个反平行的  $\beta$  桶, C 端结构域 III (残基 198-303) 主要有助于蛋白质的二聚化[14] [16]。M<sup>Pro</sup> 的活性中心位于结构域 I 和 II 间的裂谷内, 其由多个结合子位点组成, 这些子位点可以选择性结合多肽底物[17]。由于病毒对 M<sup>Pro</sup> 的功能高度依赖, 同时在人类蛋白酶中没有发现它的同源蛋白, 这使 M<sup>Pro</sup> 成为抗病毒药物设计中最重要的靶标之一[18]。

金团簇是一种介于单个原子或分子和常规纳米金颗粒之间的结构状态[19]。它是由原子或分子通过物理或化学的结合力形成的稳定纳米聚集体, 具有明确的分子组成和极小的尺寸[20] [21]。2005 年, Tsukuda 等人对一系列 Au<sub>n</sub>(SG)<sub>m</sub> 团簇分子进行了高分辨率电喷雾电质谱(ESI-MS)分析, 确定了团簇分子精确的分子式为 Au<sub>25</sub>(SG)<sub>18</sub> [22]。金团簇分子通常包含几十个到几百个金原子, 尺寸小于 2 nm [23]。通过功能性生物分子保护的团簇表现出极佳的生物相容性和生物学上的协同效应[24]。这些生物分子包括天然的或人工设计的蛋白质、多肽和核酸分子等[25] [26]。Yen-Chun 等人将设计合成的多肽分子包裹在金团簇外, 能够结合其在物理化学和生物活性上独特的功能和特性, 产生协同效应, 具有荧光性质和多肽靶向性[27]。2022 年, 高学云等人化学合成了纳米材料谷胱甘肽包裹的金团簇, 通过细胞和动物实验发现该纳米材料可直接抑制 SARS-CoV-2 病毒的复制, 同时还发现金团簇可内在下调 NF- $\kappa$ B 通路, 显著抑制细胞炎症因子的表达[28]。通过 X 射线晶体结构分析发现, 该金团簇主要通过金离子结合关键的催化残基 Cys145 位点进而抑制 M<sup>Pro</sup> 活性[28]。

在本研究中, 我们首先表达和纯化了具有高纯度和高均一性的 M<sup>Pro</sup> 蛋白质样品, 通过高通量结晶筛选的方法获得一种晶体生长条件, 得到高质量的 M<sup>Pro</sup> 单晶体。利用浸泡法, 将谷胱甘肽包裹的金团簇加入到 M<sup>Pro</sup> 晶体生长的池液中浸泡晶体, 使金团簇和 M<sup>Pro</sup> 晶体充分相互作用, 最终通过 X 射线晶体结构解析获得了一种高分辨率的新型 M<sup>Pro</sup> 三维结构。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验材料

#### 2.1.1. 质粒与菌株

构建在 pET28a 载体上的 SARS-CoV-2 M<sup>Pro</sup> 质粒来自无锡佰翱得生物科学股份有限公司; 本文中提及的谷胱甘肽包裹的金团簇纳米材料来自北京工业大学化学与生命科学学院的高学云教授馈赠; *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞购自擎科生物科技有限公司。

#### 2.1.2. 主要试剂

蛋白预染 Marker (TSP021) 来自擎科生物科技有限公司; 快速蛋白凝胶试剂盒来自深圳达科为生物技术股份有限公司; 晶体初筛试剂盒来自 Qiagen/Hampton Research/Rigaku 公司; 镍亲和胶 Ni<sup>+</sup>-Chelating Sepharose™ Fast Flow 来自 GE-Healthcare 公司。

#### 2.1.3. 主要仪器

恒温生化培养箱来自上海一恒科技有限公司; 高压蒸汽灭菌锅来自 ZEALWAY; Superdex200 凝胶层析柱(Superdex200 Increase 10/300 GL)来自 GE-Healthcare 公司; 核酸电泳仪来自北京六一仪器厂; 摇床来自上海知楚仪器有限公司; 大容量低速冷冻离心机来自上海卢湘仪离心机仪器有限公司; 高速冷冻离心机来自日立公司; 低温超高压细胞破碎仪来自广州聚能生物科技有限公司; AKTA-FPLC 蛋白纯化系统来自 GE-Healthcare 公司; 蛋白电泳仪和凝胶成像仪来自 BIO-RAD 公司; 亲和低压层析柱来自大连竞迈生物科技有限公司。

## 2.2. 方法

### 2.2.1. M<sup>Pro</sup> 蛋白的表达与纯化

将带有 M<sup>Pro</sup> 基因的 pET28a 载体的质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3)感受态细胞中, 涂布至加入卡那霉素的 LB 固体培养基平板中, 37°C 培养 12~16 hr。培养完成后, 随机挑取 3~5 个单菌落进行测序鉴定。挑选测序正确的单克隆菌落转移到 100 mL 加入卡那霉素的 LB 液体培养基中, 在 37°C, 220 rpm/min 恒温摇床中培养 16~18 hr。之后取 10 mL 菌液接种到 1 L 的 LB 液体培养基中, 37°C, 180 rpm/min 振荡培养, 待菌液吸光度 OD<sub>600</sub> 值达到 0.6 左右, 将培养温度调至 16°C 并加入 0.2 mM IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-Thiogalactoside, 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷)诱导大肠杆菌表达目的蛋白, 继续振荡培养 16~18 hr。

离心沉淀的菌体用悬菌缓冲液(20 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM 咪唑, 500 mM NaCl)悬起。随后使用高压破碎仪破碎菌体, 利用镍亲和层析柱纯化目的蛋白, 具体操作如下: 使用漂洗缓冲液(20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 50 mM 咪唑)进行漂洗, 去除杂蛋白; 使用洗脱缓冲液(20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 300 mM 咪唑)将目的蛋白从柱子上洗脱下来。向洗脱的蛋白溶液加入 TEV (Tobacco Etch Virus, 烟草蚀纹病毒)酶, 添加比例约为 15:1 (蛋白与 TEV 酶的摩尔比), 在组分为 20 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl, 1 mM DTT (Dithiothreitol, 二硫苏糖醇)溶液中 4°C 条件下过夜透析, 以切除目的蛋白上的 His 标签。透析后的样品反挂镍柱进一步纯化, 具体操作如下: 用反挂缓冲液(20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 50 mM 咪唑)平衡柱子, 把透析后无 His 标签的样品中 NaCl、咪唑浓度调节到与反挂缓冲液相同, 利用镍亲和层析柱去掉样品溶液中含有 His 标签的 TEV 酶和未被酶切的目的蛋白。将流穿样品浓缩到 500  $\mu$ L, 用 Superdex 200 10/300 分子筛进行纯化(缓冲液为 20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT)。将 M<sup>Pro</sup> 蛋白样品浓缩到 10 mg/mL, 速冻后于-80°C 条件下保存, 利用 SDS-PAGE 电泳鉴定蛋白表达与纯化的结果。

### 2.2.2. 晶体生长

利用坐滴扩散法, 使用 PEG/Ion、PEGRx、Classics、Screen、Index、Natrix、SaltRx 等晶体筛选试剂盒进行结晶条件的筛选。最终在 PEG/Ion 试剂盒的 1 号条件(0.2 M NaF, 20% PEG3350, pH 7.3)下生长出了晶体。但是初筛获得的晶体体积较小, 不符合 X 射线衍射标准, 因此对该条件进行了一定程度上的优化, 包括浓度和 pH 的微调, 最终优化获得适合 X 射线衍射的单晶体。

将金团簇浓缩至浓度为 100 mM, 使用添加了 1 mM TCEP 的蛋白结晶池液稀释金团簇至 10 mM。添加 TCEP 的目的是为了防止蛋白晶体氧化。将 M<sup>Pro</sup> 晶体浸泡在含有金团簇的结晶池液中 24 hr, 使金团簇和晶体中的蛋白质分子充分互作。

### 2.2.3. 蛋白质晶体结构解析

M<sup>Pro</sup> 晶体送至上海同步辐射光源的 BL02U1 线站进行 X 射线衍射数据收集, 波长为 0.98 Å。线站提供的 XDS 软件自动完成衍射图像的处理, 获得最终的衍射数据[29]。使用 CCP4 软件的 Phaser 进行分子置换获得初始相位信息, 初始模型为 PDB 库(<https://www.rcsb.org/>)中 PDB 号为 7LKE 的结构[30] [31]。使用 COOT 软件进行模型搭建, 使用 Phenix 和 Refmac 对结构模型进行精细化修正[32] [33] [34]。使用 CCP4 中的 CAD 和 FFT 计算反常散射密度。使用 Pymol 软件(<https://www.pymol.org/>)展示三维结构模型和完成结构比较。

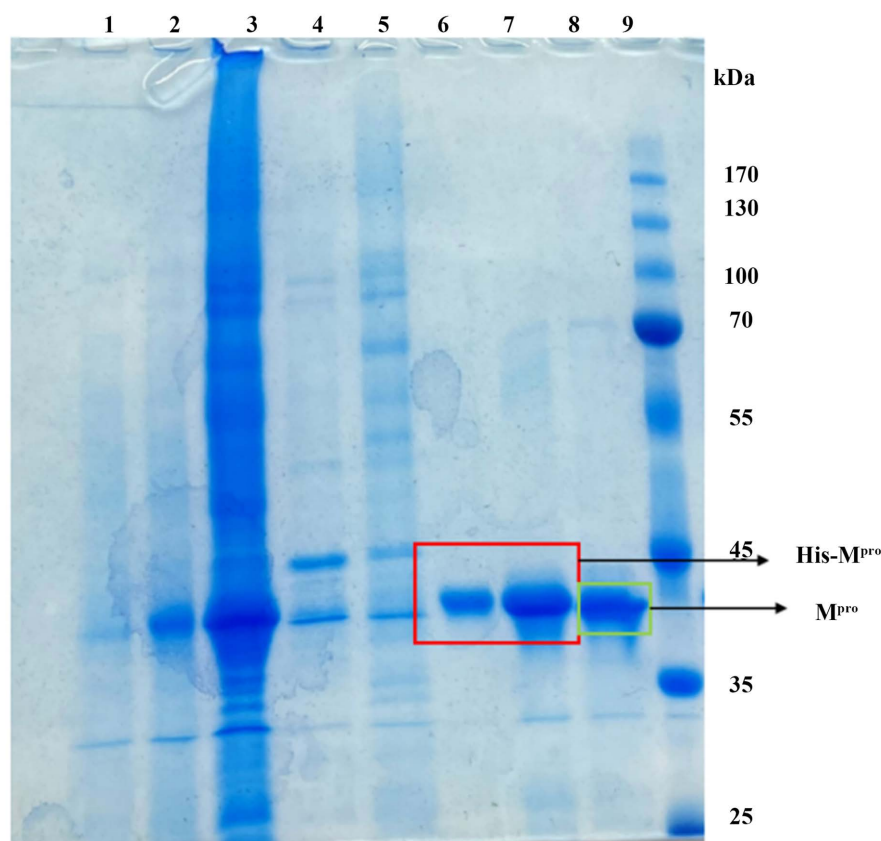
## 3. 结果与讨论

### 3.1. M<sup>Pro</sup> 蛋白表达和纯化

#### 3.1.1. M<sup>Pro</sup> 蛋白的原核表达和亲和纯化结果

通过蛋白质分子量计算网站(<https://web.expasy.org/>)计算得到 M<sup>Pro</sup> 蛋白的分子量为 33.8 kDa。N 端带

有 His 标签的  $M^{pro}$  蛋白从表达、亲和纯化、酶切到反挂镍柱的 SDS-PAGE 电泳结果如图 1 所示。从诱导后、破菌后上清液和 300 mM 咪唑洗脱样品的电泳结果中，我们可以清晰地观察到目的条带位于 35~45 kDa 之间，说明  $M^{pro}$  蛋白在大肠杆菌中已被成功表达并被初步纯化。TEV 酶切后的目的条带位置轻微下移，说明 N 端的 His 标签被有效酶切，获得无标签的具有较高纯度的  $M^{pro}$  蛋白质样品。在反挂镍柱后样品的电泳结果中没有出现 TEV 酶条带，说明带有亲和标签的 TEV 酶已被成功去除。



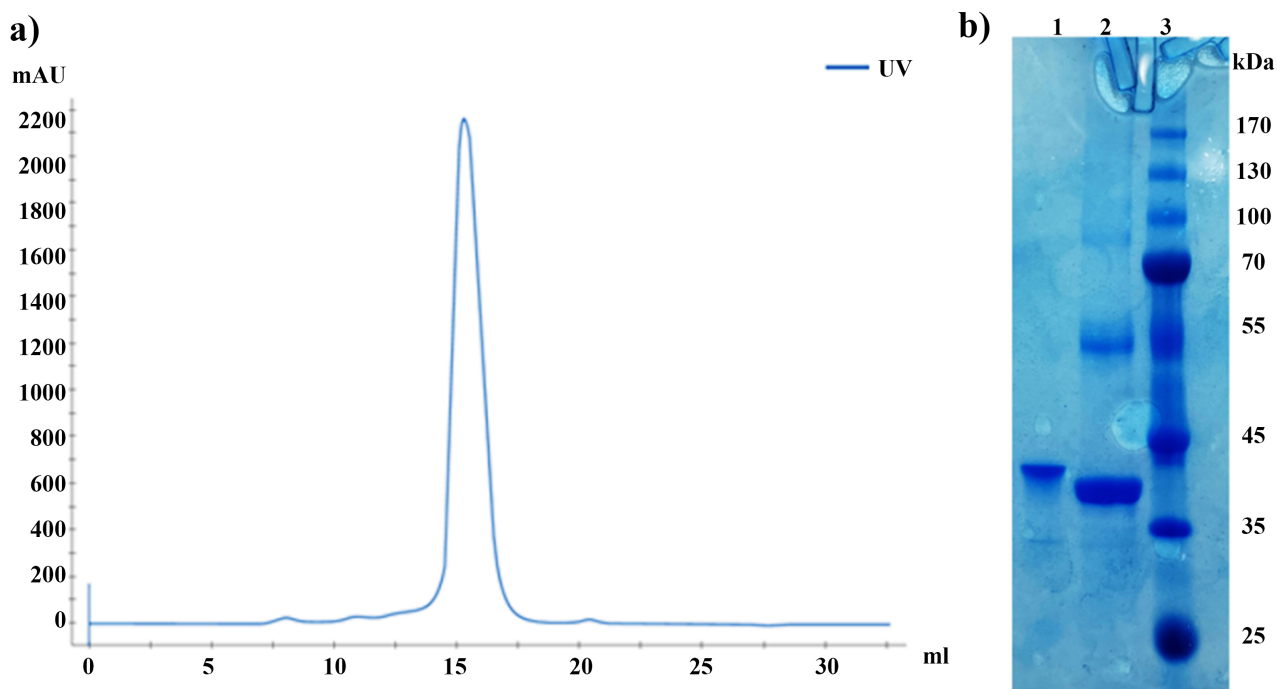
注：孔道 1：加诱导剂 IPTG 前的大肠杆菌菌液样品；孔道 2：加诱导剂后的大肠杆菌菌液样品；孔道 3：破菌离心后的上清样品；孔道 4：破菌离心后的沉淀样品；孔道 5：镍柱亲和纯化过程中的流穿样品；孔道 6：50 mM 咪唑漂洗样品；孔道 7：300 mM 咪唑洗脱样品；孔道 8：TEV 酶切后的样品；孔道 9：蛋白 Marker。红色框中条带为带 His 标签的  $M^{pro}$  蛋白；黄绿色框中条带为去除 His 标签的  $M^{pro}$  蛋白。

**Figure 1.** SDS-PAGE electrophoresis results of  $M^{pro}$  protein expression and affinity purification

**图 1.**  $M^{pro}$  蛋白表达和亲和纯化的 SDS-PAGE 电泳实验结果图

### 3.1.2. $M^{pro}$ 蛋白的凝胶过滤层析纯化结果

亲和纯化后的样品仍含有少量杂蛋白，如图 1 所示，因此采用了凝胶过滤层析对样品进一步分离纯化。图 2 展示了  $M^{pro}$  蛋白凝胶过滤层析的纯化结果，曲线显示了 280 nm 波长下紫外吸收值的变化，当液体流过 15 mL 时，紫外值陡增，此时开始收集样品。液体流过 17 mL 时紫外值下降到接近基线的位置，此时停止接样。该峰均匀平滑，峰形对称且峰值较高(2200 mAU)，峰尖位置为 16.5 mL。对收集的样品进行了 SDS-PAGE 电泳鉴定，结果显示只有一条目的蛋白的条带，说明已获得了具有高纯度和高均一性的  $M^{pro}$  蛋白质样品。

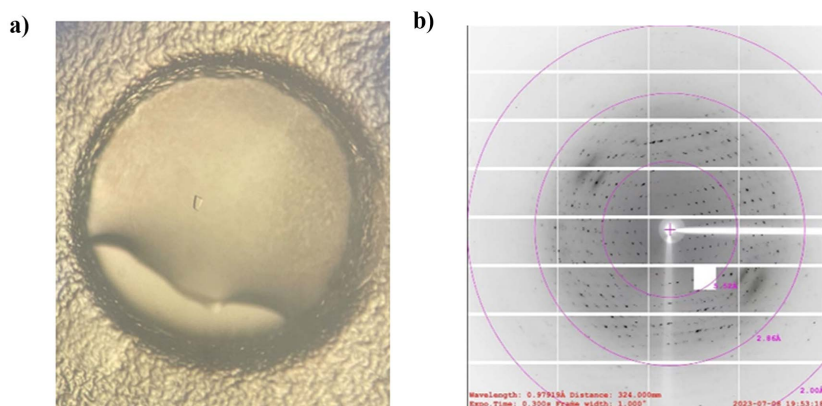


注：(a) 横坐标为流穿体积量，纵坐标为 280 nm 波长下的紫外吸收值；(b) 孔道 1：凝胶过滤层析纯化后的样品；孔道 2：TEV 酶样品；孔道 3：蛋白 Marker。

**Figure 2.** Gel filtration chromatography purification results of  $M^{\text{Pro}}$  protein. (a) UV absorption profile of gel filtration chromatography; (b) SDS-PAGE electrophoresis results of gel filtration chromatography

**图 2.**  $M^{\text{Pro}}$  蛋白凝胶过滤层析纯化结果图。(a) 凝胶过滤层析纯化的紫外吸收值曲线图；(b) 凝胶过滤层析纯化 SDS-PAGE 电泳实验结果图

### 3.2. 晶体生长和结构解析



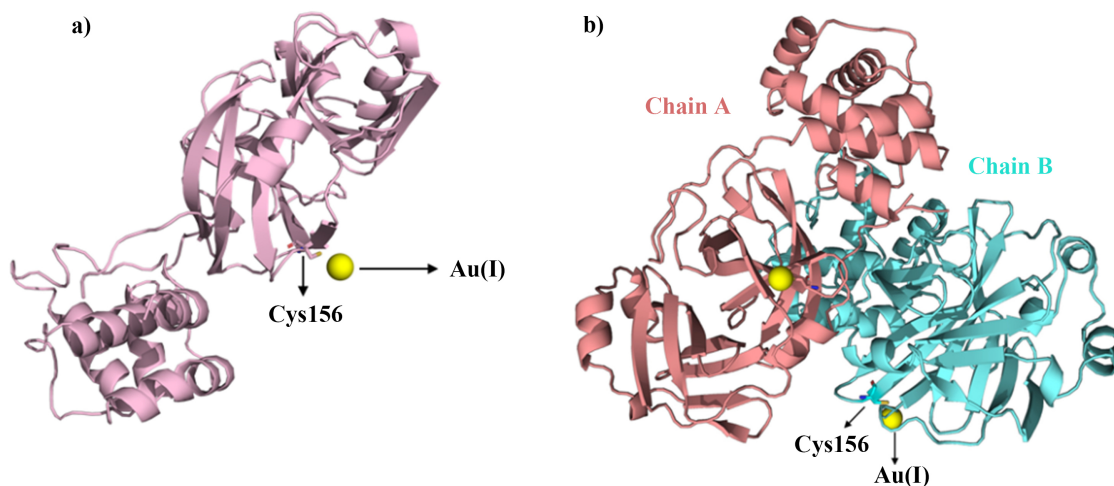
**Figure 3.** Crystal photo (a) and diffraction image (b) of  $M^{\text{Pro}}$

**图 3.**  $M^{\text{Pro}}$  的晶体照片(a)；及衍射图像(b)

我们获得的  $M^{\text{Pro}}$  蛋白高质量单晶体的结晶条件为：池液条件为 0.2 M NaF, 17.5% PEG3350, pH7.3。晶体生长时将 0.7  $\mu\text{L}$  池液与 0.4  $\mu\text{L}$  6 mg/mL 的  $M^{\text{Pro}}$  蛋白质样品进行混合，4 $^{\circ}\text{C}$  恒温恒湿培养三天。单晶体的照片如图 3(a)所示，具有一定的厚度，形状规则，大小合适。在浸泡金团簇纳米材料溶液 24 hr 之后，晶体外观无明显变化，也无碎裂情况发生，符合 X 射线衍射的要求。在上海同步辐射光源开展 X 射线衍

射数据收集时, 波长为 0.98 Å, 回摆角为 1°, 共收集了 360°, 获得 360 张衍射图片(代表性图片如图 3(b) 所示)。衍射图片经处理后的晶体学参数为: 空间群为 C2, 晶胞参数为  $a = 113.9 \text{ Å}$ ,  $b = 54.1 \text{ Å}$ ,  $c = 44.8 \text{ Å}$ ,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 101.3^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ , 衍射分辨率为 1.87 Å, 完整度为 97.6%。

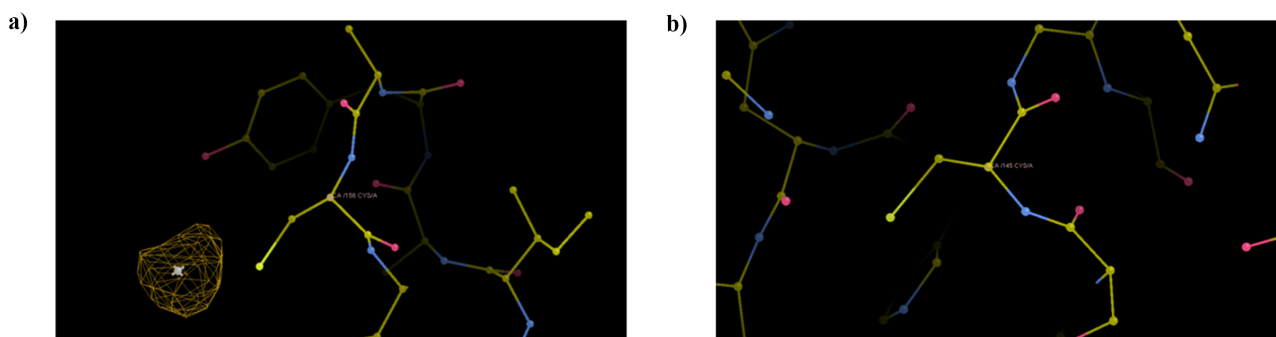
经过一系列的计算, 包括初始相位解析、模型搭建和结构精修等, 获得最终的 M<sup>Pro</sup> 三维结构。结构分析发现, 该晶体中一个不对称单元含有 1 个 M<sup>Pro</sup> 蛋白质分子, 其中只有 Cys156 一个位点结合了一个金离子, 其单体结构如图 4(a) 所示。因为 M<sup>Pro</sup> 蛋白以同型二聚体的形式发挥催化功能, 所以我们利用 Pymol 软件显示出晶体的另外一个对称单位的 M<sup>Pro</sup> 分子, 以展现出其二聚体的形式(图 4(b))。



注: 黄色的球为金离子; 棍状显示为第 156 位点的半胱氨酸残基, A 链(Chain A)和 B 链(Chain B)为两个 M<sup>Pro</sup> 单体。

**Figure 4.** Crystal structure, (a) Monomeric structure of M<sup>Pro</sup> binding to one gold ion; (b) Homodimeric structure  
**图 4.** 晶体结构图。(a) M<sup>Pro</sup> 结合金离子的单体结构; (b) 同型二聚体结构

### 3.3. 结构分析与讨论



**Figure 5.** The anomalous scattering electron density map of the M<sup>Pro</sup> crystal: a) at position 156, the orange mesh (4.0  $\sigma$ ) represents the anomalous scattering electron density; b) at position 145

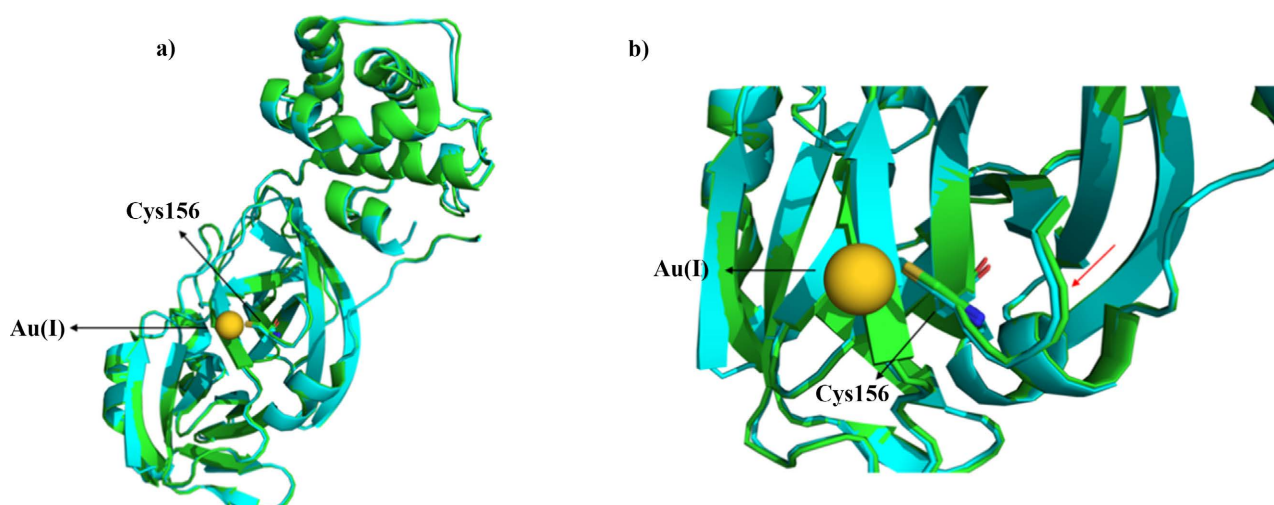
**图 5.** M<sup>Pro</sup> 晶体的反常散射电子密度图: a) 第 156 位点, 橘色网状部分(4.0  $\sigma$ )为反常散射电子密度; b) 第 145 位点

因为晶体中的金离子会有明显的反常散射信号, 所以通过对衍射数据的反常散射密度图获知金离子的位置。我们发现第 156 位点 Cys 附近有明显的反常散射密度(图 5(a)), 明确说明 M<sup>Pro</sup> 蛋白第 156 位点上的半胱氨酸结合了一个金离子。相比较而言, 第 145 位点半胱氨酸无任何反常散射信号(图 5(b)), 说明第 145 位点的半胱氨酸并无金离子结合。由于 Cys156 仅结合了一个金离子并无其他配体, 说明金团簇与

M<sup>Pro</sup> 蛋白相互作用时, 可以释放金离子, 通过金离子与半胱氨酸位点结合。晶体结构分析表明, 第 156 位点结合金离子的 M<sup>Pro</sup> 分子具备了无配体母体的大部分结构特征[35]。金离子的反常散射密度与 Cys156 的硫醇基团非常接近, 这证实金团簇释放的金离子可以与 Cys156 的硫原子进行共价结合, 形成 Au-S 键, 距离为 2.3 Å。在之前的一篇文献报道中, 来源于细粒棘球绦虫的硫氧还蛋白谷胱甘肽还原酶与溶液中的纳米材料 Au-MPO (pyridine-2-thiolN-oxide, 吡啶-2-硫醇-N-氧化物)络合物相互作用时, 也是通过 Cys519 和 Cys573 位残基的硫原子与释放的金离子共价结合并且其活性受到抑制[36]。我们的研究结果也进一步说明纳米金团簇可以通过金离子的逐步释放与蛋白质上的半胱氨酸进行不可逆的共价结合, 进而抑制蛋白质的酶活性。

将我们的结构与 PDB 库中在 Cys145 和 Cys156 两个位点都结合金离子的 M<sup>Pro</sup> 结构(PDB 号: 7DAU) 进行比较分析[28]。二者的均方根偏差(Root mean square deviation, RMSD)为 0.205 Å, 说明两个结构具有高度的相似性。该文献利用密度泛函理论方法计算了两个金离子与 M<sup>Pro</sup> 之间的相互作用能: 金离子与 Cys145 之间的键离解能为~46.1 kcal/mol, 而与 Cys156 为~26.5 kcal/mol [28]。虚拟计算分析发现 Cys145 拥有比 Cys156 更高的解离能, 因此推测金离子与 Cys145 的共价结合能力比 Cys156 更强[28]。但是, 重原子反常散射密度分析结果显示在我们的结构中 Cys145 并未结合金离子, 仅有 Cys156 一个位点结合一个金离子, 说明在真实的环境下 M<sup>Pro</sup> 蛋白质与金团簇相互作用的过程中, Cys156 比 Cys145 实际上拥有更强的金离子结合能力。此外, 除 Cys156 和 Cys145 位点外, M<sup>Pro</sup> 还含有 10 个半胱氨酸残基, 通过重原子反常散射密度分析均未发现金离子的结合, 分别是 Cys16、Cys22、Cys38、Cys44、Cys85、Cys117、Cys128、Cys160、Cys265、Cys300, 因此我们推测 Cys156 是纳米材料所释放的金离子的首选结合位点。

将我们解析的结构与之前未结合配体的 M<sup>Pro</sup> 母体结构(PDB 号: 7LKE) [30]进行叠合比较分析(图 6(a)), 发现二者的 RMSD 为 0.277 Å。虽然两个蛋白结构有较高的相似性, 但是在金离子结合位点附近的 Asp153、Tyr154、Asp155、Cys156 残基所构成的无规卷曲区域向更靠近金离子的方向发生了~0.6 Å 的偏移(图 6(b))。因此我们推测, 由于金离子与 Cys156 形成了共价键作用力, 造成位点附近的区域向更靠近金离子的方向发生了一定的偏移, 同时该变化可能影响了整个 M<sup>Pro</sup> 的构象, 进而抑制蛋白质对底物的酶切效率。



注: 蓝色卡通图为本研究报道的三维结构; 绿色卡通图为未结合任何配体的 M<sup>Pro</sup> 晶体结构(PDB 号: 7LKE); 黄色的球为金离子; 棍状显示第 156 位点半胱氨酸残基, 红色箭头指向构象变化的区域。

**Figure 6.** Comparative analysis of crystal structure and ligand-free M<sup>Pro</sup> structure; (a) Overall structure comparison; (b) Local enlargement of the binding site

**图 6.** M<sup>Pro</sup> 晶体结构与无配体结合结构的对比结果。(a) 整体结构对比图; (b) 结合位点的局部放大图



## 4. 结论

本研究首先将 SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> 的 pET28a 表达质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达菌, 通过 IPTG 诱导表达获得大量 M<sup>pro</sup> 蛋白。通过镍柱亲和层析和凝胶过滤层析, 获得了具有高纯度和高均一性的 M<sup>pro</sup> 蛋白。通过高通量晶体筛选以及 X 射线晶体衍射分析, 成功获得晶体被谷胱甘肽包裹的金团簇浸泡 24 hr 后的 1.87 Å 高分辨率三维结构。结构分析表明, 金团簇纳米材料可以通过释放金离子与 M<sup>pro</sup> 相互作用。在我们的结构中金离子仅与 Cys156 残基这一个位点发生共价结合, 而未结合 Cys145 等其他 11 个半胱氨酸残基, 说明 Cys156 是金团簇所释放的金离子的首选结合位点。与没有结合配体的 M<sup>pro</sup> 晶体结构相比, 金离子结合位点处附近由 Asp153~Cys156 构成的无规卷曲的构象向更靠近金离子的方向发生了~0.6 Å 的偏移, 推测该构象变化通过变构效应进一步抑制 M<sup>pro</sup> 的酶活反应发生。总之, 本研究所报道的晶体结构提供了一种新型的 M<sup>pro</sup> 蛋白与金团簇的互作方式, 可为冠状病毒纳米分子型抑制剂的设计提供重要信息。

## 致 谢

感谢上海同步辐射光源 BL02U1 线站的工作人员为收集 X 射线晶体数据提供技术支持。

## 基金项目

国家自然科学基金优秀青年基金项目(22122401), 北京市教委-市基金联合资助项目(KZ202210005001)。

## 参考文献

- [1] Zhou, P., Yang, X.L., Wang, X.G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.L., Chen, H.D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.D., Liu, M.Q., Chen, Y., Shen, X.R., Wang, X., Zheng, X.S., Zhao, K., Chen, Q.J., Deng, F., Liu, L.L., Yan, B., Zhan, F.X., Wang, Y.Y., Xiao, G.F. and Shi, Z.L. (2020) Addendum: A Pneumonia Outbreak Associated with a New Coronavirus of Probable Bat Origin. *Nature*, **588**, E6. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2951-z>
- [2] Kreier, F. (2022) Deltacron: The Story of the Variant That Wasn't. *Nature*, **602**, 19. <https://doi.org/10.1038/d41586-022-00149-9>
- [3] Khailany, R.A., Safdar, M. and Ozaslan, M. (2020) Genomic Characterization of a Novel SARS-CoV-2. *Gene Reports*, **19**, Article ID: 100682. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100682>
- [4] Su, S., Wong, G., Shi, W.F., Liu, J., Lai, A.C.K., Zhou, J.Y., Liu, W.J., Bi, Y.H. and Gao, G.F. (2016) Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*, **24**, 490-502. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>
- [5] Ye, Z.W., Yuan, S.F., Yuen, K.S., Fung, S.Y., Chan, C.P. and Jin, D.Y. (2020) Zoonotic Origins of Human Coronaviruses. *International Journal of Biological Sciences*, **16**, 1686-1697. <https://doi.org/10.7150/ijbs.45472>
- [6] Lee, J., Kenward, C., Worrall, L.J., Vuckovic, M., Gentile, F., Ton, A.T., Ng, M., Cherkasov, A., Strynadka, N.C.J. and Paetzl, M. (2022) X-Ray Crystallographic Characterization of the SARS-CoV-2 Main Protease Polyprotein Cleavage Sites Essential for Viral Processing and Maturation. *Nature Communications*, **13**, Article No. 5196. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32854-4>
- [7] Fan, K.Q., Wei, P., Feng, Q., Chen, S.D., Huang, C.K., Ma, L., Lai, B., Pei, J.F., Liu, Y., Chen, J.G. and Lai, L.H. (2004) Biosynthesis, Purification, and Substrate Specificity of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 3C-Like Proteinase. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 1637-1642. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310875200>
- [8] Zhao, Y., Zhu, Y., Liu, X., Jin, Z.M., Duan, Y.K., Zhang, Q., Wu, C.Y., Feng, L., Du, X.Y., Zhao, J.Y., Shao, M.L., Zhang, B., Yang, X.N., Wu, L.J., Ji, X.Y., Guddat, L.W., Yang, K.L., Rao, Z.H. and Yang, H.T. (2022) Structural Basis for Replicase Polyprotein Cleavage and Substrate Specificity of Main Protease from SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **119**, e2117142119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2117142119>
- [9] Klemm, T., Ebert, G., Calleja, D.J., Allison, C.C., Richardson, L.W., Bernardini, J.P., Lu, B.G.C., Kuchel, N.W., Grohmann, C., Shibata, Y., Gan, Z.Y., Cooney, J.P., Doerflinger, M., Au, A.E., Blackmore, T.R., Van Noort, G.J.V., Geurink, P.P., Ova, H., Newman, J., Riboldi-Tunnicliffe, A., Czabotar, P.E., Mitchell, J.P., Feltham, R., Lechtenberg, B.C., Lowes, K.N., Dewson, G., Pellegrini, M., Lessene, G. and Komander, D. (2020) Mechanism and Inhibition of the

- Papain-Like Protease, PLpro, of SARS-CoV-2. *EMBO Journal*, **39**, e106275. <https://doi.org/10.15252/embj.2020106275>
- [10] Milligan, J.C., Zeisner, T.U., Papageorgiou, G., Joshi, D., Soudy, C., Ulferts, R., Wu, M., Lim, C.T., Tan, K.W., Weissmann, F., Canal, B., Fujisawa, R., Deegan, T., Nagaraj, H., Bineva-Todd, G., Basier, C., Curran, J.F., Howell, M., Beale, R., Labib, K., Reilly, N.O. and Diffley, J.F.X. (2021) Identifying SARS-CoV-2 Antiviral Compounds by Screening for Small Molecule Inhibitors of Nsp5 Main Protease. *Biochemical Journal*, **478**, 2499-2515. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210197>
- [11] Li, X. and Song, Y.C. (2023) Structure and Function of SARS-CoV and SARS-CoV-2 Main Proteases and Their Inhibition: A Comprehensive Review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **260**, Article ID: 115772. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115772>
- [12] Stobart, C.C., Sexton, N.R., Munjal, H., Lu, X.T., Molland, K.L., Tomar, S., Mesecar, A.D. and Denison, M.R. (2013) Chimeric Exchange of Coronavirus Nsp5 Proteases (3CLpro) Identifies Common and Divergent Regulatory Determinants of Protease Activity. *Journal of Virology*, **87**, 12611-12618. <https://doi.org/10.1128/JVI.02050-13>
- [13] Lu, X.T., Lu, Y.Q. and Denison, M.R. (1996) Intracellular and *in Vitro*-Translated 27-KDa Proteins Contain the 3C-Like Proteinase Activity of the Coronavirus MHV-A59. *Virology*, **222**, 375-382. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0434>
- [14] Zhang, L.L., Lin, D.Z., Sun, X.Y.Y., Curth, U., Drosten, C., Sauerhering, L., Becker, S., Rox, K. and Hilgenfeld, R. (2020) Crystal Structure of SARS-CoV-2 Main Protease Provides a Basis for Design of Improved  $\alpha$ -Ketoamide Inhibitors. *Science*, **368**, 409-412. <https://doi.org/10.1126/science.abb3405>
- [15] Xiong, M.Y., Su, H.X., Zhao, W.F., Xie, H., Shao, Q. and Xu, Y.C. (2021) What Coronavirus 3C-Like Protease Tells Us: From Structure, Substrate Selectivity, to Inhibitor Design. *Medicinal Research Reviews*, **41**, 1965-1998. <https://doi.org/10.1002/med.21783>
- [16] Goyal, B. and Goyal, D. (2020) Targeting the Dimerization of the Main Protease of Coronaviruses: A Potential Broad-Spectrum Therapeutic Strategy. *ACS Combinatorial Science*, **22**, 297-305. <https://doi.org/10.1021/acscombsci.0c00058>
- [17] Costanzi, E., Kuzikov, M., Esposito, F., Albani, S., Demitri, N., Giabbai, B., Camasta, M., Tramontano, E., Rossetti, G., Zaliani, A. and Storici, P. (2021) Structural and Biochemical Analysis of the Dual Inhibition of MG-132 against SARS-CoV-2 Main Protease (Mpro/3CLpro) and Human Cathepsin-L. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, Article 11779. <https://doi.org/10.3390/ijms222111779>
- [18] Su, H.L., Zhou, F., Huang, Z.R., Ma, X.H., Natarajan, K., Zhang, M.C., Huang, Y. and Su, H.B. (2021) Molecular Insights into Small-Molecule Drug Discovery for SARS-CoV-2. *Angewandte Chemie International Edition*, **60**, 9789-9802. <https://doi.org/10.1002/anie.202008835>
- [19] Bergamaschi, G., Metrangolo, P. and Dichiarante, V. (2022) Photoluminescent Nanocluster-Based Probes for Bioimaging Applications. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **21**, 787-801. <https://doi.org/10.1007/s43630-021-00153-4>
- [20] Qian, H.F., Zhu, M.Z., Wu, Z.K. and Jin, R.C. (2012) Quantum Sized Gold Nanoclusters with Atomic Precision. *Accounts of Chemical Research*, **45**, 1470-1479. <https://doi.org/10.1021/ar200331z>
- [21] Yuan, Q., Wang, Y.L., Zhao, L.N., Liu, R., Gao, F.P., Gao, L. and Gao, X.Y. (2016) Peptide Protected Gold Clusters: Chemical Synthesis and Biomedical Applications. *Nanoscale*, **8**, 12095-12104. <https://doi.org/10.1039/C6NR02750D>
- [22] Negishi, Y., Nobusada, K. and Tsukuda, T. (2005) Glutathione-Protected Gold Clusters Revisited: Bridging the Gap Between Gold(I)-Thiolate Complexes and Thiolate-Protected Gold Nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society*, **127**, 5261-5270. <https://doi.org/10.1021/ja042218h>
- [23] Zhou, C., Hao, G.Y., Thomas, P., Liu, J.B., Yu, M.X., Sun, S.S., Oz, O., Sun, X.K. and Zheng, J. (2013) Near-Infrared Emitting Radioactive Gold Nanoparticles with Molecular Pharmacokinetics. *Angewandte Chemie International Edition*, **51**, 10118-10122. <https://doi.org/10.1002/anie.201203031>
- [24] Zhou, C., Sun, C., Yu, M.X., Qin, Y.P., Wang, J.G., Kim, M. and Zheng, J. (2010) Luminescent Gold Nanoparticles with Mixed Valence States Generated from Dissociation of Polymeric Au(I) Thiolates. *The Journal of Physical Chemistry C*, **114**, 7727-7732. <https://doi.org/10.1021/jp9122584>
- [25] Kao, H.W., Lin, Y.Y., Chen, C.C., Chi, K.H., Tien, D.C., Hsia, C.C., Lin, W.J., Chen, F.D., Lin, M.H. and Wang, H.E. (2014) Biological Characterization of Cetuximab-Conjugated Gold Nanoparticles in a Tumor Animal Model. *Nanotechnology*, **25**, Article ID: 295102. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/29/295102>
- [26] Zeng, C.J., Li, T., Das, A., Rosi, N.L. and Jin, R.C. (2013) Chiral Structure of Thiolate-Protected 28-Gold-Atom Nanocluster Determined by X-Ray Crystallography. *Journal of the American Chemical Society*, **135**, 10011-10013. <https://doi.org/10.1021/ja404058q>
- [27] Shiang, Y.C., Huang, C.C., Chen, W.Y., Chen, P.C. and Chang, H. T. (2012) Fluorescent Gold and Silver Nanoclusters

- for the Analysis of Biopolymers and Cell Imaging. *Journal of Materials Chemistry*, **22**, 12972-12982. <https://doi.org/10.1039/c2jm30563a>
- [28] He, Z.S., Ye, F., Zhang, C.Y., Fan, J.D., Du, Z.Y., Zhao, W.C., Yuan, Q., Niu, W.C., Gao, F.P., He, B., Cao, P., Zhao, L.A., Gao, X.J., Gao, X.F., Sun, B., Dong, Y.H., Zhao, J.C., Qi, J.X., Liang, X.J., Jiang, H.D., Gong, Y., Tan, W.J. and Gao, X.Y. (2022) A Comparison of Remdesivir versus Gold Cluster In COVID-19 Animal Model: A Better Therapeutic Outcome of Gold Cluster. *Nano Today*, **44**, Article ID: 101468. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2022.101468>
- [29] Kabsch, W. (2010) XDS. *Structural Biology*, **66**, 125-132. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
- [30] Narayanan, A., Narwal, M., Majowicz, S.A., Varricchio, C., Toner, S.A., Ballatore, C., Brancale, A., Murakami, K.S. and Jose, J. (2022) Identification of SARS-CoV-2 Inhibitors Targeting Mpro and PLpro Using In-Cell-Protease Assay. *Communications Biology*, **5**, Article No. 169. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03090-9>
- [31] McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C. and Read, R.J. (2007) Phaser Crystallographic Software. *Journal of Applied Crystallography*, **40**, 658-674. <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>
- [32] Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) Coot: Model-Building Tools for Molecular Graphics. *Structural Biology*, **60**, 2126-2132. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>
- [33] Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C. and Zwart, P.H. (2010) PHENIX: A Comprehensive Python-Based System for Macromolecular Structure Solution. *Acta Crystallogr. Structural Biology*, **66**, 213-221. <https://doi.org/10.1107/S0907444909052925>
- [34] Murshudov, G.N., Skubák, P., Lebedev, A.A., Pannu, N.S., Steiner, R.A., Nicholls, R.A., Winn, M.D., Long, F. and Vagin, A.A. (2011) REFMAC5 for the Refinement of Macromolecular Crystal Structures. *Structural Biology*, **67**, 355-367. <https://doi.org/10.1107/S0907444911001314>
- [35] Jin, Z.M., Du, X.Y., Xu, Y.C., Deng, Y.Q., Liu, M.Q., Zhao, Y., Zhang, B., Li, X.F., Zhang, L.K., Peng, C., Duan, Y.K., Yu, J., Wang, L., Yang, K.L., Liu, F.J., Jiang, R.D., Yang, X.L., You, T., Liu, X.C., Yang, X.N., Bai, F., Liu, H., Liu, X., Guddat, L.W., Xu, W.Q., Xiao, G.F., Qin, C.F., Shi, Z.L., Jiang, H.L., Rao, Z.H. and Yang, H.T. (2020) Structure of M<sup>pro</sup> From SARS-CoV-2 and Discovery of Its Inhibitors. *Nature*, **582**, 289-293. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>
- [36] Salinas, G., Gao, W., Wang, Y., Bonilla, M., Yu, L., Novikov, A., Virginio, V.G., Ferreira, H.B., Vieites, M., Gladyshev, V.N., Gambino, D. and Dai, S.D. (2017) The Enzymatic and Structural Basis for Inhibition of Echinococcus Granulosus Thioredoxin Glutathione Reductase by Gold(I). *Antioxidants & Redox Signaling*, **27**, 1491-1504. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6816>