

猪流行性腹泻病毒 *Nsp5* 基因的原核表达及生物信息学分析

刘正奎¹, 吴媛², 陈琳¹, 王磊¹, 牟泓焯¹, 祝徐航¹, 王晓杜^{1,*}

(1. 浙江农林大学 动物科技学院, 浙江 杭州 311300; 2. 金华职业技术学院 农业生物工程学院, 浙江 金华 321007)

摘要: 旨在对猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) *Nsp5* 基因进行原核表达, 利用生物信息学软件, 预测其编码蛋白的结构和功能, 为了解 PEDV 致病机理奠定基础。本研究克隆 PEDV/LY/2014/04 毒株的 *Nsp5* 基因, 亚克隆进 pET-28a(+) 原核表达载体, PCR 和酶切验证重组质粒的构建, 重组质粒 pET-28a(+) -*Nsp5* 转入 *E. coli* BL21(DE3) 中, SDS-PAGE 检测 *Nsp5* 的表达和 His band Ni+ 纯化情况, Vector NTI Advance 等软件对 *Nsp5* 蛋白氨基酸组成、抗原表位、二级和三级结构进行预测和分析。结果表明, 成功克隆并构建了重组质粒 pET-28a(+) -*Nsp5*, 表达重组蛋白大小约 22 ku, 且主要以包涵体形式存在, His band Ni+ 纯化后获得高纯度重组蛋白。*Nsp5* 蛋白是由 196 个氨基酸残基组成的多肽, 其分子质量的理论值为 21 820.07 u, 理论等电点 (pI) 为 8.734, 略偏碱; 二级结构骨架中 α -螺旋 (h) 占 55.61%, β -折叠 (t) 占 7.65%, 无规则卷曲 (c) 占 20.92%, 延伸链 (e) 占 15.82%; *Nsp5* 蛋白质的三级结构中, 中间段以 α -螺旋为主作为骨架, C 端多个复杂二级结构构成该蛋白的酶活性中心; B 细胞抗原表位的预测, 表明有 15 个潜在的 B 细胞优势表位。本研究为猪流行性腹泻病毒 *Nsp5* 蛋白质的生物学功能相关研究提供数据支持。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; *Nsp5* 基因; 原核表达; 生物信息学分析

中图分类号: S855.3

文献标志码: A

文章编号: 1004-1524(2019)04-0532-07

Prokaryotic expression and bioinformatics analysis of *Nsp5* gene of porcine epidemic diarrhea virus

LIU Zhengkui¹, WU Yuan², CHEN Lin¹, WANG Lei¹, MU Hongye¹, ZHU Xuhang¹, WANG Xiaodu^{1,*}

(1. College of Animal Science and Technology, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China; 2. School of Agricultural and Biological Engineer, Jinhua Polytechnic, Jinhua 321007, China)

Abstract: Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) nonstructural protein 5 (*Nsp5*) gene was expressed by the prokaryotic expression system and the structure of the encoded protein was predicted by bioinformatics software for understanding the pathogenicity mechanism of PEDV. In this study, the *Nsp5* gene of PEDV/LY/2014/04 strain was subcloned into prokaryotic expression vector pET-28a, and the recombinant plasmid was identified by polymerase chain reaction (PCR) and restriction enzyme digestion. The recombinant plasmid pET-28a(+) -*Nsp5* was transformed into competent cells of *Escherichia coli* BL21(DE3). The expression and purification effect of *Nsp5* were detected by SDS-PAGE. The Vector NTI Advance, online software was utilized to predict and analyze the amino acid composition, epitope, secondary and tertiary structure of *Nsp5* protein. The results showed that the recombinant plas-

收稿日期: 2018-10-05

基金项目: 浙江省科技重点研发计划 (2018C02028); 浙江省自然科学基金 (LY16C180001); 金华市重点研发计划 (2016-2-013, 2018-2-004)

作者简介: 刘正奎 (1992—), 男, 安徽合肥人, 硕士研究生, 研究方向为动物病毒免疫学。E-mail: 1766851933@qq.com

* 通信作者, 王晓杜, E-mail: xdwang@zafu.edu.cn

mid pET-28a(+) -*Nsp5* was successfully constructed, and approximately 22 ku recombinant protein was expressed and mainly existed in the form of inclusion bodies. High-purity recombinant protein was obtained after purifying by His band Ni+. The *Nsp5* protein consisted of a polypeptide with 196 amino acid residues. The theoretical molecular mass of the slightly alkaline recombinant protein was 21 820.07 u, and the theoretical isoelectric point(pI) was 8.734. The secondary structure was composed of 55.61% α -helix(h), 7.65% β -fold(t), 20.92% irregular curl(c) and 15.82% extended chain(e). In the tertiary structure of the *Nsp5* protein, the middle segment skeleton is mainly formed by α -helix, and a plurality of complex secondary structures at the C-end constituted the enzyme active center of the protein. The prediction of B cell epitope indicated that there were 15 potential B cell dominant epitope. This study provided data support for studying on the biological function of the porcine epidemic diarrhea virus *Nsp5* protein.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus; *Nsp5* gene; prokaryotic expression; bioinformatics analysis

猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 常感染 3~10 日龄仔猪,可引起该猪群发生猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED),临床症状以急性肠炎和脱水致死为特征的高度传染性疾病。PEDV 感染猪群,仔猪发病率和死亡率都很高,一年四季均可发病,自 2011 年以来,新的变异毒株开始在各地纷纷流行^[1-3],现已出现在世界各个国家和地区^[4-6],给养猪业带来严重的经济损失^[7-8]。

猪流行性腹泻病毒属于冠状病毒科冠状病毒属 α 型冠状病毒,其复制酶蛋白是由 ORF1a 和 ORF1b 基因编码的 PP1a 和 PP1ab 前体蛋白,经病毒编码蛋白酶加工而成,形成至少 16 个非结构蛋白(nonstructural proteins, NSPs),从 PP1a 或 PP1ab 的氨基端起依次为 *Nsp1-16*,这些蛋白在病毒的转录、复制、抗宿主细胞防御机制过程中发挥重要功能^[9-10]。其中 *Nsp5* 被称为 3C 样蛋白酶^[11],是一种富含组氨酸和半胱氨酸的蛋白酶^[12],该蛋白酶具有切割活性,可以将多聚前体蛋白 PP1ab 切割为成熟的非结构蛋白 *Nsp4-16*^[11]。除了具有切割活性外,还发现 *Nsp5* 是一种干扰素的拮抗分子^[13],同时在病毒复制过程中,对 N 蛋白进行加工修饰,调节 PEDV 对宿主细胞的适应性^[14]。因此,研究 PEDV 的 *Nsp5* 蛋白结构及相关功能对了解该病毒的致病机理,开发新型抗病毒药物具有重要意义。本研究通过克隆 *Nsp5* 基因,构建原核表达载体,在大肠埃希菌进行表达,同时利用生物信息学软件进行结构预测分析,为解析 *Nsp5* 的功能提供生物材料和数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

PEDV/LY/2014/04 分离株来自临床腹泻样本,由本实验室分离得到,保存于浙江农林大学动物预防医学与公共卫生实验室;pET-28a(+) 载体由本实验室保存。

1.2 主要试剂

E. coli DH5 α 和 BL21(DE3) 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司;T4 连接酶、限制性内切酶 *SalI* 和 *EcoR I* 购自 NEB 公司;质粒小提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;KOD plus Neo 购自 TOYOBO 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 引物设计与合成

依据猪流行性腹泻病毒 CV777 疫苗株全基因组序列(GenBank: KT323979),利用序列比对方法,找到编码 *Nsp5* 的基因,使用 DNASTar 中的 Primer Select 软件进行 *Nsp5* 基因片段的引物设计。设计一对扩增 *Nsp5* 基因的特异性引物,上下游引物两端添加 *EcoR I* 和 *Sal I* 酶切位点,扩增片段大小为 616 bp。引物由上海生工生物工程有限公司合成,如表 1。

1.3.2 *Nsp5* 基因扩增

采用 TRIZOL 法提取 PEDV/LY/2014/04 分离株的 RNA,随机引物反转录得到其 cDNA,以此 cDNA 为模板进行目的片段 *Nsp5* 的 PCR 扩增。PCR 扩增体系:r *Taq* Mix 10 μ L, dd H₂O 6 μ L,上下游引物各 1 μ L, cDNA 模板 2 μ L,共 20 μ L。PCR

表 1 *Nsp5* 基因扩增引物及鉴定引物Table 1 *Nsp5* gene amplification primers and identification primers

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')	目的片段大小 Product size/bp
<i>Nsp5</i> -Fwd	CCGGAATTCATGTTGCAGAGTGTTCATCTACTTATGTAG	616
<i>Nsp5</i> -Rev	GACGTCGACTCACTGGAGCTTAACAATACGCTCAC	
<i>Nsp5</i> -Fwd	CCGGAATTCATGTTGCAGAGTGTTCATCTACTTATGTAG	705
T7-Terminal	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	

扩增条件: 预变性 94 °C 3 min; 94 °C 变性 45 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.3.3 重组质粒 pET-28a(+) -*Nsp5* 构建

利用胶回收试剂盒将 *Nsp5* 扩增片段纯化回收, 利用 *EcoR* I 和 *Sal* I 进行双酶切, 同时用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切 pET-28a(+) 载体, 酶切结束电泳后切胶回收, 两种酶切产物按照适宜比例, 利用 T4 连接酶在 16 °C 过夜连接。连接产物经热击法转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 涂布卡那霉素的平板, 37 °C 过夜培养, 挑取单个菌落进行菌落 PCR 鉴定。鉴定呈阳性的菌落经扩大培养后, 质粒小提试剂盒提取质粒, 再进行 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定, 酶切鉴定正确的克隆送交上海生工生物有限公司进行测定验证。测序验证正确的重组质粒命名 pET-28a(+) -*Nsp5*。

1.3.4 His-*Nsp5* 重组蛋白的诱导表达

将 1.3.3 节构建正确的 pET-28a(+) -*Nsp5* 重组质粒转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 涂布于含卡那霉素抗性的 LB 平板, 37 °C 过夜培养, 分别挑选 3~5 个单菌落于 LB 液体培养基, 37 °C、220 r·min⁻¹ 培养 12~16 h, 以此为种子液。种子液按照体积比 1:100 转接液体 LB 培养基里, 当菌液的 D_{600} 值在 0.5~0.6 时, 取 1 mL 菌液作为诱导前样品, 加入终浓度为 1 mmol·L⁻¹ 的 IPTG, 在 37 °C、200 r·min⁻¹ 进行诱导表达, 诱导 6 h 后取 1 mL 菌液作为诱导后样品, 所取样品处理后进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色后分析重组 *Nsp5* 蛋白表达情况。

1.3.5 His-*Nsp5* 重组蛋白的纯化

少量表达验证成功的克隆, 扩大培养后进行大量诱导, 收集大量诱导表达菌体后, 用 PBS 缓冲液重悬, 冰浴超声破碎 30 min, 离心收集包涵体沉淀。包涵体沉淀经尿素溶解后, 在 4 °C、

12 000 r·min⁻¹ 离心 25 min, 上清移至新的离心管; 将上清与平衡过的镍柱在 4 °C 结合 3~4 h, 待结合液流出, 加入 30 mL 50 mmol·L⁻¹ 咪唑洗除杂蛋白, 然后缓慢持续地加入 5 mL 400 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱目的蛋白, 收集洗脱下来的目的蛋白, 酶标仪测定蛋白浓度, 纯化得到的蛋白加入等体积 100% 甘油, 保存于 -80 °C 备用。纯化后目的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 分析 His band Ni + 纯化后重组蛋白的纯度和表达量。

1.3.6 *Nsp5* 蛋白质的生物信息学分析

Vector NTI Advance 软件对 *Nsp5* 蛋白质的化学性质进行理论分析(包括分子质量、等电点以及氨基酸组成等), ProtScale(<http://web.expasy.org/protscale/>) 分析 *Nsp5* 蛋白质的亲水性与疏水性, ABCpred 服务器在线分析了 *Nsp5* 蛋白的 B 细胞潜在抗原表位, SOPMA 服务器在线分析了 *Nsp5* 蛋白质二级结构预测, Phyre2.0(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 预测分析 *Nsp5* 蛋白质的 3D 结构, Raswin 软件初步预测了 *Nsp5* 蛋白质的三级结构。

2 结果与分析

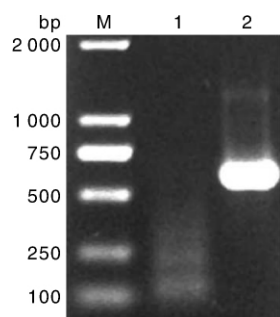
2.1 *Nsp5* 基因的 PCR 扩增及重组表达载体的 PCR 鉴定

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳显示, 大小约 616 bp, 与预期大小相符(图 1)。将 *Nsp5* 的 PCR 产物和载体 pET-28a(+) 用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 进行双酶切之后, 经 T4 连接酶连接, 热击转化至 DH5 α 感受态细胞中, 得到重组载体 pET-28a(+) -*Nsp5*。通过 PCR 的方法, 鉴定引物为目的基因的上游引物 *Nsp5*-Fwd 和载体 pET-28a(+) 的 T7-Terminal 引物(表 1), 同时通过双酶切(*EcoR* I 和 *Sal* I) 鉴定的方法, 筛选

并验证得到阳性克隆(图2)。阳性克隆送生物公司测序,序列比对结果表明,该序列与 GenBank 的 PEDV 毒株(KM213245) 同源性高达 99%,且编码框插入正确。

2.2 重组蛋白的诱导表达及鉴定

将重组质粒 pET-28a(+) -*Nsp5* 转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中,经 IPTG 诱导,SDS-PAGE 分析结果显示,在诱导后样品泳道出现了特异性蛋白表达,其分子质量约为 22 ku,与预期大小相符(图3)。针对诱导后的包涵体沉淀,采用 His band Ni+ 柱进行纯化,所得样品进行 SDS-PAGE 检测,结果获得纯度达到 70% 以上

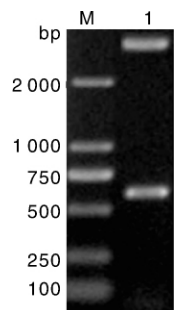


M, DL 2000 bp DNA 标准分子量; 1, 阴性对照; 2, *Nsp5* 基因 PCR 扩增产物。

M, DL 2000 bp DNA marker; Lane 1, Negative control; Lane 2, *Nsp5* gene PCR products.

图1 *Nsp5* 基因 PCR 扩增结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of *Nsp5* PCR products

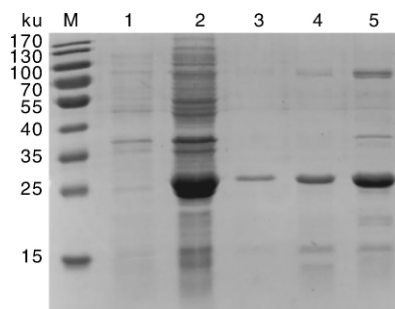


M, DL 2000 bp DNA 标准分子量; 1, pET-28a(+) -*Nsp5* 经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切产物。

M, DL 2000 bp DNA marker; Lane 1, pET-28a(+) -*Nsp5* digested by *EcoR* I and *Sal* I.

图2 pET-28a(+) -*Nsp5* 双酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant pET-28a(+) -*Nsp5* plasmid by double enzyme digestion



M, 低分子量标准蛋白质 Marker; 1, pET-28a(+) -*Nsp5* 未经 IPTG 诱导全菌样品; 2, pET-28a(+) -*Nsp5* 经 IPTG 诱导后全菌样品; 3-5, pET-28a(+) -*Nsp5* 包涵体纯化后蛋白浓度由低到高的样品。

M, Low molecular weight standard protein marker; Lane 1, Non-induced pET-28a(+) -*Nsp5*; Lane 2: IPTG induced pET-28a(+) -*Nsp5*; Lane 3-5, Different concentrations of purified protein.

图3 *Nsp5* 蛋白表达产物 SDS-PAGE 电泳

Fig.3 SDS-PAGE analysis of *Nsp5* protein expression

的重组蛋白(His-*Nsp5*)。

2.3 猪流行性腹泻病毒 *Nsp5* 蛋白质的生物信息学分析

2.3.1 理化性质

猪流行性腹泻病毒的 *Nsp5* 的基因含有 1 个由 591 bp 组成的开放阅读框,编码 196 个氨基酸残基组成的多肽,其中 A + T = 55.50%、C + G = 44.50%,蛋白质分子质量的理论值为 21 820.07 u,理论等电点(pI)为 8.734,在正常生理状态下,该蛋白带正电荷;原子组成是 $C_{954}H_{1553}N_{275}O_{291}S_9$;正电荷残基共有(Lys + Arg) 24 个,负电荷残基(Asp + Glu) 21 个。该蛋白质由 16 种氨基酸组成,其中 Val、Ala、Ser、Arg 的含量相对较多,Cys、Phe、Trp 相对较少。不稳定系数(instability index)为 42.90,表明这个蛋白质性质不稳定。脂肪系数为 95.97,总平均亲水性为 -0.214。亲水性分析结果表明该蛋白质是亲水蛋白质(图4)。

2.3.2 *Nsp5* 蛋白质的高级结构预测

SOPMA 服务器预测结果显示,该蛋白质二级结构骨架(图5)组成包含: α -螺旋(h)占 55.61%、 β -折叠(t)占 7.65%、无规则卷曲(c)占 20.92%、延伸链(e)占 15.82%。利用 Phyre2.0 蛋白质结构预测服务器(使用 Intensive 选项)对 *Nsp5* 蛋白质进行三级结构预测,结果显示,所得结构有较多的 α -螺旋和无规则卷曲(图6),结合图

5的结果,三级结构预测和二级结构预测基本一致。

2.3.3 Nsp5 蛋白质 B 细胞表位预测

应用 ABCpred 服务器对 Nsp5 蛋白的 B 细胞潜在抗原表位进行预测(阈值设定为 0.51,窗口大小设定为 16),结果如表 2: Nsp5 蛋白共有 15 个潜在的 B 细胞抗原表位,其中 41—56 位 aa 得分最高(结果按得分降序排列,得分越高则意味着是目的肽段的可能性越大),PEDV 感染猪群的血清中可能存在特异性抗体。

3 讨论

作为冠状病毒复制起始的主要蛋白酶,Nsp5 不仅在病毒非结构蛋白加工方面发挥重要作用,而且参与酶解宿主蛋白^[15]、RNA 结合以及病毒

复制等过程^[16-17],Zhu 等^[18]报道猪流行性腹泻病毒 3C 样蛋白酶通过切割 NEMO 调节其干扰素 β 拮抗作用,因此一直被认为是开发抗冠状病毒

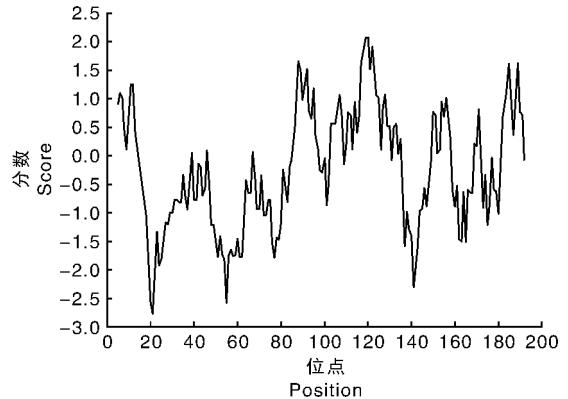


图4 Nsp5 蛋白质的亲水性与疏水性分析
Fig.4 Hydrophilicity and hydrophobicity analysis of Nsp5 protein

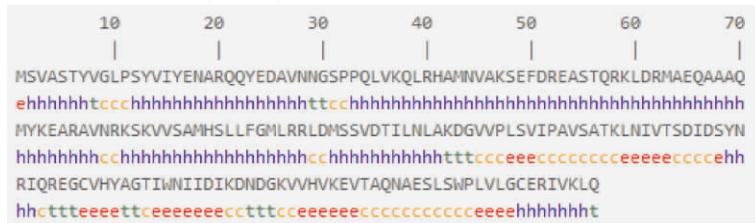


图5 Nsp5 蛋白质二级结构模拟图
Fig.5 Simulated secondary structure of protein Nsp5

药物的有效靶标^[19]。本研究通过利用 pET-28a (+) 原核表达系统,成功构建并在 *E. coli* BL21 (DE3) 中诱导表达了 PEDV/LY/2014/04 分离株的重组 His-Nsp5 蛋白,利用生物信息学软件分析该蛋白,为今后该病的诊断技术和免疫机制研究提供重要的基础信息。

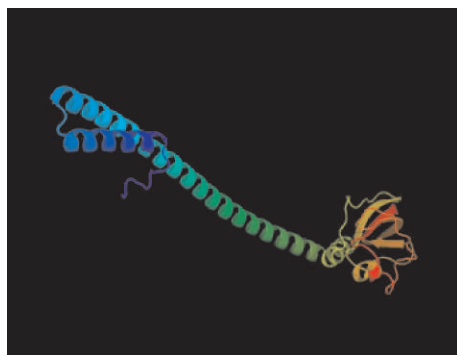


图6 Nsp5 蛋白质 3D 构象预测
Fig.6 Prediction of the 3D structure of protein Nsp5

表2 PEDV/LY/2014/04 分离株 Nsp5 的 B 细胞表位预测
Table 2 Prediction of B cell epitopes of PEDV/LY/2014/04 isolate Nsp5

序号 No.	B 细胞抗原表位潜在序列 B cell epitope potential sequence	位置 Position/aa	得分 Score
1	HAMNNAKSEFDREAST	41-56	0.95
2	NARQQYEDAVNNGSPP	18-33	0.86
3	IWNIIKNDNDGKVVH	154-169	0.85
4	VGLPSYVIYENARQQY	8-23	0.83
5	TSDIDSYNRIQREGCV	133-148	0.82
6	AAQMYKEARAVNRKS	67-82	0.81
7	VHVKEVTAQNAESLS	167-182	0.81
8	DMSSVDITILNLAKDGV	100-115	0.81
9	RIQREGCVHYAGTIW	140-155	0.78
10	IKDNDGKVVHVKEVTA	160-175	0.76
11	VVSAMHSLFLGMLRRL	84-99	0.73
12	DREASTQRKLDRAEQ	51-66	0.73
13	AESLSWPLVLGGERIV	178-193	0.70
14	DGVVPLSVIPAVSATK	113-128	0.69
15	GSPPQLVKQLRHAMNV	30-45	0.58

运用结构基因组学研究方法, 基因克隆、蛋白质纯化、晶体的筛选和晶体衍射数据的收集, 构建出病毒晶体结构, 是研究 PEDV 3C 样蛋白酶结构的关键技术。St. John 等^[12] 通过 X 射线晶体衍射的技术分析了 3C 样蛋白酶的空间结构, 3C 样蛋白酶在空间群 $P2_12_12_1$ 中结晶为不对称单元的二聚体。如人类冠状病毒 229E 3C 样蛋白酶^[20] 和 SARS 3C 样蛋白酶^[21] 所报道的一样, PEDV 3C 样蛋白酶是在每个单体中含有三个结构域的同型二聚体, 含有由残基 Cys144 和 His41 形成的二元催化体系, 其活性位点位于结构域 I 和 II 之间的裂缝中, 结构域 III 参与单体二聚化, 其最终负责形成蛋白酶的活性^[22]。正是因为研究者解析了该蛋白的结构, 发展了许多 3C 样蛋白酶抑制剂, 很多抑制剂能有效抑制冠状病毒的复制^[19, 23]。

PEDV 的 Nsp5 基因序列比对分析表明, Nsp5 基因是 PEDV 基因组中比较保守的区段, 保证了其功能正确实施。PEDV 的 Nsp5 分子质量理论值为 21 820.07 u, 理论等电点 (pI) 为 8.734; 具有多个高亲水性区域, 属于亲水蛋白质; SOPMA 服务器 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 是常用的蛋白质预测二级结构在线工具, 该工具可以预测蛋白二级结构、蛋白质序列中的复杂基序、构建蛋白质的 3D 模型, Nsp5 则主要由 α -螺旋和无规则卷曲构成; Phyre2.0 蛋白质结构预测服务器 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 主要用于蛋白质的 3D 结构和高级结构, Nsp5 则主要由螺旋结构构成。ABCpred 服务器 (<http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/>) 是采用机器学习算法, 依赖于 Bcipep 数据库, 对固定长度的多肽进行 B 细胞表位预测, Nsp5 蛋白共有 15 个潜在的 B 细胞抗原表位, 原核表达产物可作为设计新型疫苗的靶标, 也可作为检测 PEDV 病毒抗体的 ELISA 检测方法的包被抗原, 可以判定是否存在 PEDV 的感染。

本研究开展了 Nsp5 蛋白的原核表达, 对其理化性质、B 细胞抗原表位、高级结构预测方面进行了生物信息学分析, 为 Nsp5 蛋白的研究提供了基本数据资料, 可为后续深入探讨 Nsp5 蛋白在猪流行性腹泻病毒复制过程中的作用机理

研究奠定一定的基础, 也为进一步开展 PEDV 的诊断技术及免疫学研究奠定了基础。

参考文献 (References):

- [1] LI W T, LI H, LIU Y B, et al. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(8): 1350–1353.
- [2] ZHAO X Y, LI Z L, ZENG X D, et al. Sequence analysis of the spike gene of *Porcine epidemic diarrhea virus* isolated from South China during 2011–2015 [J]. *Journal of Veterinary Science*, 2017, 18(2): 237–243.
- [3] VAN DIEP N, SUEYOSHI M, NORIMINE J, et al. Molecular characterization of US-like and Asian non-S INDEL strains of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) that circulated in Japan during 2013–2016 and PEDVs collected from recurrent outbreaks [J]. *BMC Veterinary Research*, 2018, 14(1): 96–107.
- [4] LARA-ROMERO R, GÓMEZ-NUÑEZ L, CERRITEÑO-SÁNCHEZ J L, et al. Molecular characterization of the spike gene of the porcine epidemic diarrhea virus in Mexico, 2013–2016 [J]. *Virus Genes*, 2018, 54(2): 215–224.
- [5] SUN J, LI Q J, SHAO C Y, et al. Isolation and characterization of Chinese porcine epidemic diarrhea virus with novel mutations and deletions in the S gene [J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 221: 81–89.
- [6] MESQUITA J R, HAKZE-VAN DER HONING R H V, ALMEIDA A, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea virus in Portugal, 2015 [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2015, 62(6): 586–588.
- [7] LI Z L, ZHU L, MA J Y, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field strains in south China [J]. *Virus Genes*, 2012, 45(1): 181–185.
- [8] JUNG K, ANNAMALAI T, LU Z Y, et al. Comparative pathogenesis of US porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain PC21A in conventional 9-day-old nursing piglets vs. 26-day-old weaned pigs [J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 178(1/2): 31–40.
- [9] ZHANG Q Z, SHI K C, YOO D. Suppression of type I interferon production by porcine epidemic diarrhea virus and degradation of CREB-binding protein by nsp1 [J]. *Virology*, 2016, 489: 252–268.
- [10] ZHANG Q Z, KE H Z, BLIKSLAGER A, et al. Type III interferon restriction by porcine epidemic diarrhea virus and the role of viral protein nsp1 in IRF1 signaling [J]. *Journal of Virology*, 2017, 92(4): JVI.01677–17.
- [11] YE G, DENG F, SHEN Z, et al. Structural basis for the dimerization and substrate recognition specificity of porcine epidemic diarrhea virus 3C-like protease [J]. *Virology*,

- 2016, 494: 225 – 235.
- [12] ST JOHN S E, ANSON B J, MESECAR A D. X-ray structure and inhibition of 3C-like protease from porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 25961.
- [13] WANG D, FANG L R, SHI Y L, et al. Porcine epidemic diarrhea virus 3C-like protease regulates its interferon antagonism by cleaving NEMO [J]. *Journal of Virology*, 2016, 90(4): 2090 – 2101.
- [14] JARU-AMPORN PAN P, JENGARN J, WANITCHANG A, et al. Porcine epidemic diarrhea virus 3C-like protease-mediated nucleocapsid processing: possible link to viral cell culture adaptability [J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(2): e01660 – 16.
- [15] ZHU X Y, WANG D, ZHOU J W, et al. Porcine deltacoronavirus nsp5 antagonizes type I interferon signaling by cleaving STAT2 [J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(10): pii: e00003 – 17.
- [16] TOMAR S, JOHNSTON M L, ST JOHN S E, et al. Ligand-induced dimerization of middle east respiratory syndrome (MERS) coronavirus nsp5 protease (3CLpro) [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(32): 19403 – 19422.
- [17] PERLMAN S, NETLAND J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(6): 439 – 450.
- [18] ZHU X Y, FANG L R, WANG D, et al. Porcine deltacoronavirus nsp5 inhibits interferon- β production through the cleavage of NEMO [J]. *Virology*, 2017, 502: 33 – 38.
- [19] SHI Y J, LEI Y Y, YE G, et al. Identification of two antiviral inhibitors targeting 3C-like Serine/3C-like protease of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 213: 114 – 122.
- [20] REN Z L, YAN L M, ZHANG N, et al. The newly emerged SARS-like coronavirus HCoV-EMC also has an “Achilles’ heel”: current effective inhibitor targeting a 3C-like protease [J]. *Protein & Cell*, 2013, 4(4): 248 – 250. [LinkOut]
- [21] SHI J H, HAN N Y, LIM L, et al. Dynamically-driven inactivation of the catalytic machinery of the SARS 3C-like protease by the N₂14A mutation on the extra domain [J]. *PLoS Computational Biology*, 2011, 7(2): e1001084.
- [22] LEE C C, KUO C J, KO T P, et al. Structural basis of inhibition specificities of 3C and 3C-like proteases by zinc-coordinating and peptidomimetic compounds [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(12): 7646 – 7655.
- [23] KUMAR V, TAN K P, WANG Y M, et al. Identification, synthesis and evaluation of SARS-CoV and MERS-CoV 3C-like protease inhibitors [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2016, 24(13): 3035 – 3042.

(责任编辑 张韵)

