

# 猪沙波病毒 CH430 株 p70 基因克隆与生物信息学分析

刘伟<sup>1</sup>, 王恩丽<sup>1,2</sup>, 柳纪省<sup>1</sup>, 杨彬<sup>1</sup>, 兰喜<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 草食动物疫病重点开放实验室, 甘肃兰州 730046; 2. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃兰州 730070)

**摘要:** 利用 RT-PCR 方法从猪沙波病毒 CH430 株中克隆出非结构蛋白 p70 基因并测序, 结果显示, p70 基因全长 1 995 nt, 编码 665 个氨基酸, 经同源性比对及遗传进化树分析表明, CH430 株为基因Ⅲ型沙波病毒毒株。生物信息学分析显示该蛋白理论等电点(pI)为 5.96, 理论分子质量为 72 876.6 u; 其序列上共发现 25 个磷酸化位点, 分别为 Ser(6)、Thr(13)、Tyr(6), 而蛋白的磷酸化与信号传导有关, 预测该蛋白为一重要的信号传导分子; 无信号肽和跨膜区; 该蛋白含有胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶和 RdRp 功能域; 胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶功能域核心结构为 1 个由 7 个  $\beta$  折叠形成柱状结构和 1 个由 1 个  $\alpha$  螺旋和 7 个  $\beta$  折叠扭曲平行形成 1 个不完全的桶状结构共同组成, RdRp 功能域核心结构为 1 个具有 3 个子结构域空间结构, 该结构与右手掌在形态上非常相似, 而 3 个子结构域也被认为是手指、手掌和拇指。

**关键词:** 猪沙波病毒; 非结构蛋白 p70; 克隆; 生物信息学分析

**中图分类号:** Q78; S432 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2014)03-0046-06

## Cloning and Bioinformatics Analysis of Porcine Sapovirus CH430 Non-structural Protein p70 Gene

LIU Wei<sup>1</sup>, WANG En-li<sup>1,2</sup>, LIU Ji-xing<sup>1</sup>, YANG Bin<sup>1</sup>, LAN Xi<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory of Grazing Animal Diseases, Lanzhou Veterinary Research Institute Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China; 2. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** The non-structural protein p70 gene of PoSaV CH430 strain was cloned by RT-PCR and then sequenced in our study. The results showed that the full length of p70 gene was 1 995 nt encoding a protein of 665 aa. Homology alignment and evolutionary tree showed that PoSaV CH430 strain belong to GⅢ. The bioinformatics analysis demonstrated that the isoelectric point and molecular weight of non-structural protein p70 were 5.96 and 72 876.6 u. The protein had no signal peptide and transmembrane domain. There were 25 phosphorylation sites including 6 Sers, 13 Thrs and 6 Tyrs. Protein phosphorylation was concerned with signal transduction, so this protein may be a signaling molecule. There were Trypsin-like serine proteases and RdRp functional domain. Main structure of trypsin-like serine proteases functional domain was a column structure and an incomplete  $\beta$ -barrel. Main structure of RdRp functional domain was a fold whose organisation has been likened to the shape of a right hand with three sub-domains termed fingers, palm and thumb.

**Key words:** Porcine sapovirus; Non-structural protein p70; Clone; Bioinformatics analysis

猪沙波病毒(Porcine Sapovirus, PoSaV)又名猪札幌病毒、猪札幌病毒,属于嵌杯病毒科(Caliciviridae)沙波病毒属<sup>[1]</sup>(Sapoviruses, SaVs),是猪非细菌性急性胃肠炎的主要病原体之一,主要以粪便、口腔

途径传播。PoSaV 感染各年龄段,尤其是断奶仔猪,并引起仔猪腹泻。1980 年, PoSaV 首先在美国一仔猪粪便中被检测到<sup>[2]</sup>。此后,许多国家相继报道发现了该病毒<sup>[3-5]</sup>,并呈现出复杂的遗传多样性。

收稿日期: 2014-03-02

作者简介: 刘伟(1986-),女,河北唐山人,硕士,主要从事动物传染病分子生物学研究。

通讯作者: 兰喜(1971-),男,甘肃临泽人,副研究员,硕士生导师,博士,主要从事动物传染病及其病原分子流行病学研究。

PoSaV 在腹泻猪群和健康猪群都有较高的检出率,而部分 PoSaV 株与人沙波病毒(Human sapovirus, HuSaV)在遗传上和抗原特性上非常相似,使得人们不禁开始担心相同基因型的病毒是否可以在不同物种间感染传播,指出猪可能是 HuSaV 的储存宿主并把病毒传染给人,这就给人类的健康带来了潜在威胁。在国际上 PoSaV 的总体研究水平尚处于起步阶段,而国内对于 PoSaV 的研究非常少,加强对它的研究具有重要的意义。

PoSaV 是无囊膜正链单股 RNA 病毒,基因组 RNA 链长为 7.3 ~ 7.4 kb,包括 2 个开放阅读框(ORFs)。*ORF1* 编码 1 个大的多聚蛋白,这一前体蛋白边翻译边被病毒蛋白酶裂解,产生结构蛋白(衣壳蛋白,VP1)和 6 种非结构蛋白,依次是 p11、p28、NTPase、p32、Viral genome-linked protein(VPg)、p70(propol)和 VP1。有研究表明,SaV 中 *ORF1* 编码的多聚蛋白的剪切位点位于谷氨酸(E)或谷氨酰胺(Q)和丙氨酸(A)、甘氨酸(G)或丝氨酸(S)之间<sup>[6]</sup>。根据序列比对发现预测的 PoSaV *ORF1* 剪切位点与理论相符。*ORF2* 编码一种小的碱性蛋白,功能未知。非结构蛋白 p70 具有 3C 样蛋白酶和 3D 样聚合酶功能,与兔出血症病毒结构相似,3C 样蛋白酶可能具有半胱氨酸蛋白酶活性,是一种病毒蛋白酶,参与病毒多聚蛋白翻译后加工过程;3D 样聚合酶是一种 RNA 模板依赖性 RNA 聚合酶(RdRp),普遍存在于正链 RNA 病毒中,是病毒复制增值过程中必需的酶<sup>[7]</sup>,它能以病毒 RNA 为模板复制子代病毒的基因<sup>[8]</sup>,在戊肝病毒中可以将病毒增殖过程中需要的蛋白质和酶类基因转录为 mRNA<sup>[9-10]</sup>。此外,RdRp 基因在病毒长期进化过程中是非常保守的,可以根据 RdRp 基因相似性来划分病毒基因型。目前根据 RdRp 基因序列可将 SaV 分为 5 种基因型,近期又有几种新型 SaV 被发现。研究和分析非结构蛋白 p70 序列特征和结构与功能特性,对于研究控制沙波病毒感染与传播有重要的意义。本研究通过对沙波病毒西北分离株(CH430)非结构蛋白 p70 基因进行克隆,利用生物信息学软件分析 p70 序列的信号肽、跨膜区、磷酸化位点、结构和功能域、三级结构预测等,意在为猪沙波病毒诊断及致病机理的研究提供条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 样品 猪沙波病毒 CH430 株由中国农业科学院兰州兽医研究所传染病研究室分离、鉴定和保存。

1.1.2 菌株及载体 pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司;大肠杆菌 JM109 感受态细胞购自大连 TaKaRa 公司。

1.1.3 主要试剂 RNeasy Mini Kit 试剂盒购自 QIAGEN 公司;One Step RNA PCR Kit(AMV)试剂盒、限制性内切酶 *Not* I、DL2000 Marker、DL5000 Marker 均购自大连 TaKaRa 公司;质粒 DNA 小量制备试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒均购自爱思进生物技术有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据 GenBank 上已公布的 PoSaV 全基因组序列(FJ387164 和 JX678943),设计了 2 对特异性引物;S1 上游引物:5'-CTGAGCGAGGCTAAAGGG-3',下游引物:5'-TTGAG-GCTGTGGCTGCTG-3';S2 上游引物:5'-GCCGT-TCACCAGYGTMTATAA-3',下游引物:5'-GTGTGKTC-CARGTRACRTT-3'。引物由金唯智生物科技(北京)有限公司合成。

1.2.2 病毒总 RNA 的提取 取猪粪样按 1:9 的比例与 PBS 混匀,8 000 r/min 离心 10 min,取上清 160  $\mu$ L 按照 RNeasy Mini Kit 试剂盒说明书提取病毒 RNA。

1.2.3 非结构蛋白 p70 基因的扩增 按照 One Step RNA PCR Kit(AMV)试剂盒说明,使用一步 RNA 扩增法扩增 S1、S2 片段。采用 50  $\mu$ L 反应体系:RNA 模板 7  $\mu$ L,10  $\times$  One Step RNA PCR Buffer 5  $\mu$ L,MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L) 10  $\mu$ L,dNTP Mixture(10 mmol/L) 5  $\mu$ L,RNase Inhibitor(40 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L,AMV RTase XL(5 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L,AMV-Optimized *Taq*(5 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L,上下游引物各 1  $\mu$ L,加 RNase Free ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu$ L。反应程序包括:50  $^{\circ}$ C 反转录 45 min;95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min;95  $^{\circ}$ C 变性 30 s,50  $^{\circ}$ C 退火 40 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s,循环 35 次;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4  $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 非结构蛋白 p70 基因的克隆与鉴定 将 PCR 扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳观察,按照胶回收试剂盒回收纯化目的片段,目的片段与 pGEM-T Easy 载体连接(反应体系:2  $\times$  Rapid ligation Buffer 5  $\mu$ L,pGEM-T Easy 1  $\mu$ L,PCR 回收产物 3  $\mu$ L,T4 DNA ligase 15  $\mu$ L),离心后,16  $^{\circ}$ C 连接过夜,连接产物转入大肠杆菌 JM109 感受态细胞。在含 Amp、X-Gal 及 IPTG 的鉴定培养基上,37  $^{\circ}$ C 培养 12 ~ 16 h 后挑取单个白色菌落,接种到含有 Amp 的 LB 培养液增菌后,提取质粒进行 PCR 和酶切鉴定,筛选的阳性重组质粒送上海生工公司测序。

1.2.5 非结构蛋白 *p70* 基因的生物信息学分析  
应用 DNASTar 软件包中的 Editseq 软件将得到的核酸序列推导为氨基酸序列。通过 ProParam 在线软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白质的理论分子质量、理论等电点、不稳定系数等。应用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对蛋白进行信号肽预测。运用 NetPhos 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测蛋白的磷酸化位点。应用 InterProScan 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) 分析蛋白一级结构中包含的结构与功能域特性。运用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白的三级结构。

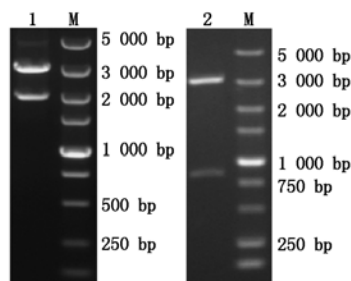
## 2 结果与分析

### 2.1 非结构蛋白 *p70* 基因的扩增

以提取的病毒 RNA 为模板,经过 RT-PCR 扩增得到大小分别为 1 878 bp 和 822 bp 的特异性目的条带,与预计大小相符。

### 2.2 重组质粒的鉴定

重组质粒经 PCR 扩增及 *Not* I 酶切鉴定均得到约 1 800 bp 和 800 bp 大小的条带(图 1),说明目的片段成功克隆入 pGEM-T Easy 载体。



1. S1 段酶切产物;2. S2 段酶切产物;M. 5 000 bp DNA 分子质量标准。

1. S1 product of recombinant plasmid with restriction enzyme;

2. S2 product of recombinant plasmid with restriction enzyme;

M. DL5000 DNA Marker.

图 1 pGEM-T-S1 与 pGEM-T-S2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pGEM-T-S1 and pGEM-T-S2 by *Not* I

### 2.3 测序结果

所扩增的 PoSaV CH430 株 S1、S2 序列分别为 1 878 bp 和 844 bp,包括了非结构蛋白 *p70* 基因,根据推测的剪切位点,可知道 *p70* 基因大小为 1 995 bp,编码 665 个氨基酸。测序结果已提交 GenBank,获得的登录号为 KF204570。

### 2.4 非结构蛋白 *p70* 的基本理化性质

本试验获得的 *p70* 基因(KF204570)长 1 995 bp,编码 665 个氨基酸,其中含量最多的氨基酸是 Ala(66 个,9.9%)。没有 Pyl(O)、Sec(U)、(B)、

(Z)、(X)。强碱性氨基酸总数(Arg + Lys, 59 个)少于强酸性氨基酸总数(Asp + Glu, 70 个)。理论等电点(pI)为 5.96。预测相对理论分子量为 72 876.6 u,原子组成为  $C_{3225}H_{5026}N_{890}O_{974}S_{32}$ 。预测体外半衰期为 30 h(哺乳动物类网状细胞),大于 20 h(酵母内)以及大于 10 h(大肠杆菌内)。不稳定系数为 40.17,归类为不稳定蛋白。脂肪系数为 77.59,亲水性(GRAVY)为 -0.267。

### 2.5 信号肽分析

通过 SignalP 4.1 在线软件分析,非结构蛋白 *p70* 无信号肽,为非分泌蛋白。

### 2.6 磷酸化位点预测

应用 NetPhos 2.0 软件预测,结果表明(图 2)该氨基酸序列包含了 25 个可能的磷酸化位点,其中有 6 个位于 Ser(S),13 个位于 Thr(T),6 个位于 Tyr(Y)。

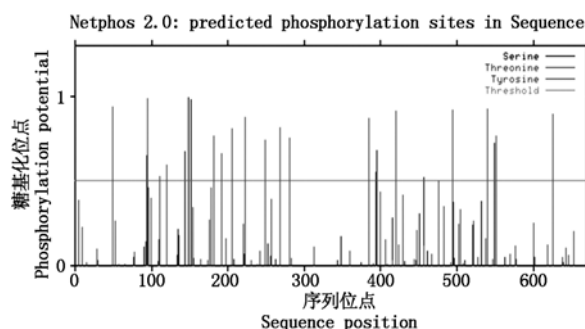


图 2 poSaV 非结构蛋白 *p70* 的磷酸化位点预测结果

Fig. 2 Phosphorlation analysis for poSaV non-structural protein *p70*

### 2.7 结构和功能域预测

应用 InterProScan 软件分析非结构蛋白 *p70* 中含有多个结构和功能域(图 3)。其中包括 2 个大的功能域和几个小的蛋白活性区域,在蛋白的 N 端有一胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶,与诺瓦克病毒 3C 样蛋白酶同源,具有半胱氨酸蛋白酶活性,属于半胱氨酸蛋白酶 C24 家族。在蛋白的 C 端是一大段的 RdRp 功能域,RdRp 在许多正链 RNA 病毒中发现,它催化合成 RNA 互补链,使其作为 RNA 模板进行病毒的复制,但是该反应精确的分子机制还不是很清楚。

### 2.8 蛋白三级结构预测

应用 SWISS-MODEL 在线预测非结构蛋白 *p70* 的三维结构,蛋白 *p70* 第 5 ~ 149 位氨基酸的三级结构预测以诺瓦克病毒蛋白酶(PDB ID: 2lncA)为模板,如图 4-A;而蛋白 *p70* 第 154 ~ 648 位氨基酸的三级结构的预测以人沙波病毒 RdRp 蛋白(PDB ID: 2wk4B)为模板,如图 4-B。

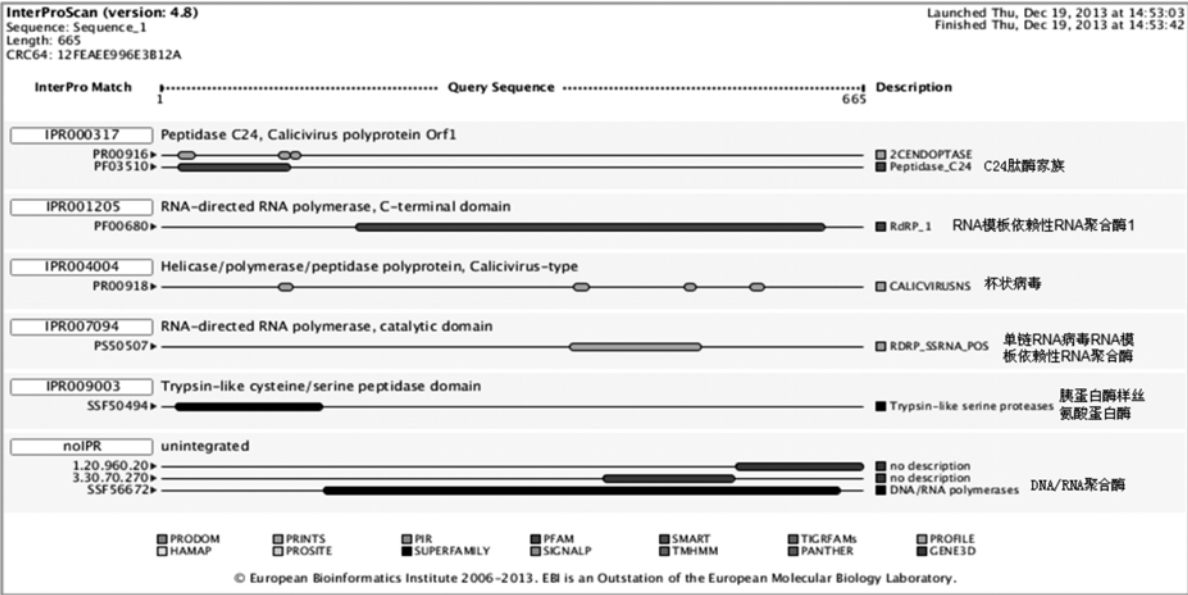
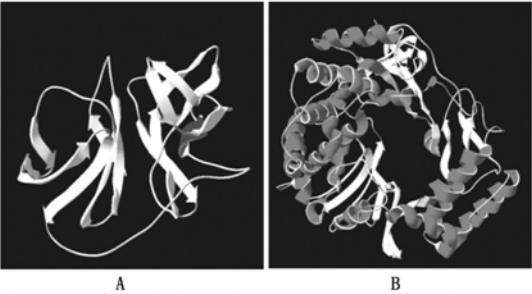


图 3 非结构蛋白 p70 结构和功能域预测

Fig. 3 The analysis of the structural and functional domains for non-protein p70



灰色代表  $\alpha$ -螺旋,白色代表  $\beta$ -折叠;A. 对氨基酸序列第 5 ~ 149 位预测的三维结构;B. 对氨基酸序列第 154 ~ 648 位预测的三维结构。  
 $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet were showed in gray and white, respectively; A. The three-dimension structure of sequence between aa 5 to aa 149; B. The three-dimension structure of sequence between aa 154 to aa 648.

图 4 非结构蛋白 p70 的 3D 结构模型

Fig. 4 The three-dimension structure of non-structural protein p70

2.9 系统进化分析

从 NCBI 上下载了属于不同基因型的 SaV 非结构蛋白 p70 基因序列,构建了系统进化树,结果(图

5)显示,PoSaV CH430 株属于 SaV G III 基因型,并且本身在一个独立分支上,可能会形成一种 SaV 新的亚基因型。

3 讨论

2008 年,PoSaV 首次在上海和江苏地区的规模化猪场腹泻猪的粪便中检测到<sup>[11]</sup>,此后,许多地区包括河北、安徽、湖南等相继报道了该病毒的存在,且感染率较高<sup>[12-14]</sup>。PoSaV 能够感染各年龄段的猪,特别是断奶仔猪,感染后表现出以腹泻为主的肠胃炎症状<sup>[15-16]</sup>,腹泻样品大多数都能检测到多种病毒<sup>[5,17]</sup>,这就对单独研究 PoSaV 造成了一定的影响。迄今为止,PoSaV 的致病机理和免疫机制还不是很清楚,对该病毒的诊断和防控等研究进展缓慢,这就需要加强对 PoSaV 的研究。

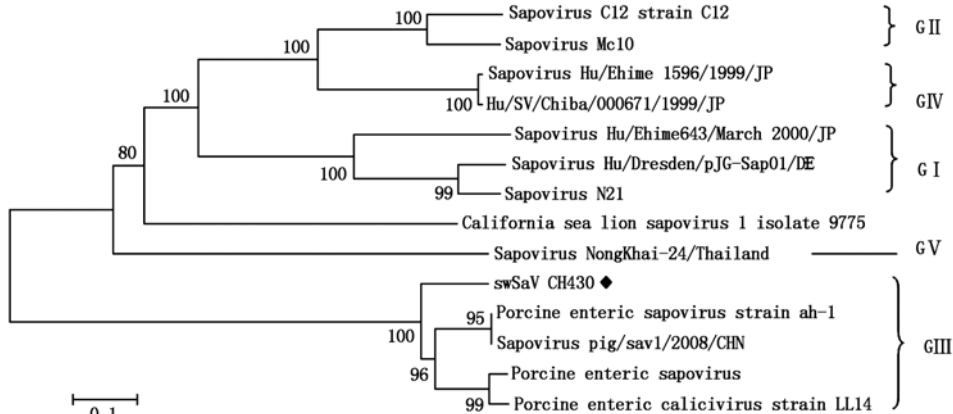


图 5 SaV 非结构蛋白 p70 基因的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on SaV non-structural protein p70 gene

本试验克隆了 PoSaV CH430 株非结构蛋白 p70 基因,测序结果表明,该基因全长 1 995 nt,编码 665 个氨基酸。PoSaV CH430 株为中国西北地区被测序的第一株 SaV 株,对研究中国不同地区 SaV 的遗传进化有重要意义。作者将 PoSaV CH430 株与 GenBank 数据库中已知基因型的 13 株 SaV 参考毒株进行比对和遗传进化树分析。结果发现, PoSaV CH430 株与基因型 III 型参考毒株处于一个大的分支上,所以可以推断该株属于 SaV 基因型 III 型。

信号肽是新合成的分泌蛋白多肽链中用于指导蛋白质跨膜转移(定位)的 N-末端的氨基酸序列,一般由 15~30 个氨基酸组成,蛋白成熟后信号肽将被剪切掉。应用生物信息学软件对非结构蛋白 p70 进行信号肽预测,结果表明不存在信号肽。这就避免了 PoSaV CH430 株非结构蛋白 p70 表达后被剪切掉信号肽,可得到完整的 PoSaV CH430 株非结构蛋白 p70;也可避免在本研究中所预测的磷酸化位点落在信号肽区域内而被剪切掉。

对 PoSaV CH430 株非结构蛋白 p70 的磷酸化位点进行预测,得到 25 个潜在的磷酸化位点。蛋白的磷酸化/去磷酸化对蛋白活性的发挥有重要作用,刘善荣等<sup>[18]</sup>认为蛋白的先后磷酸化可将细胞膜外的信号传导到细胞核,从而控制所需蛋白的转录翻译。而病毒的感染、复制及转录都需要复杂的信号传导途径和多种信号分子参与。非结构蛋白 p70 被预测存在多个潜在的磷酸化位点,指示该蛋白与细胞信号转导的有关,可能是一种重要的信号转导分子,推测 p70 蛋白与 SaV 的 RNA 复制转录密切相关。

本研究通过 InterProScan 软件对非结构蛋白 p70 进行结构和功能域的预测,再结合通过 SWISS-MODEL 服务器同源建模的三维结构图,得到 p70 蛋白包含两个大的结构域,分属于不同蛋白家族,具有不同的功能。该蛋白第 5~154 位与诺瓦克病毒 3C 样蛋白酶同源,属于 MEROPS 肽酶家族 C24,具有半胱氨酸蛋白酶活性。三维结构显示在蛋白的 N 端由 7 个  $\beta$  折叠形成筒状结构,C 端由 1 个  $\alpha$  螺旋和 7 个  $\beta$  折叠扭曲平行形成 1 个不完全的桶状结构。这一结构特征与诺瓦克病毒 3C 样蛋白酶结构相似<sup>[19,20]</sup>,所以推测 p70 蛋白第 5~154 位具有相同的结构和功能位点;有研究表明,所有的 RdRp 和大部分 DNA 依赖聚合酶形成一种具有 3 个子结构域空间结构,该结构与右手掌在形态上非常相似,而 3 个子结构域也被认为是手指、手掌和拇指<sup>[21]</sup>。同源建模的 p70 蛋白第 154~643 位也形成了相似的空

间结构,推测该部分蛋白与 RdRp 功能相同,与病毒 RNA 复制相关。

本研究成功地克隆 PoSaV CH430 非结构蛋白 p70 的基因序列,并翻译出氨基酸,应用多种生物信息学软件对其信号肽、磷酸化位点、结构与功能区、三级结构等进行了分析。上述结果为深入研究非结构蛋白 p70 的分子结构和功能及其发挥该功能的活性位点的验证奠定了基础。三级结构的预测,利于对 p70 蛋白的生物分子结构直观、形象地了解,便于今后深入探究 PoSaV 的致病机理、免疫机制等。

#### 参考文献:

- [1] Green K Y, Ando T, Balayan M S, *et al.* Taxonomy of the caliciviruses [J]. *Journal Infectious Diseases*, 2000, 181 (S2): S322 - S330.
- [2] Saif L J, Bohl E H, Theil K W, *et al.* Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs [J]. *Journal Clin Microbiol*, 1980, 12(1): 105 - 111.
- [3] Kim H J, Cho H S, Cho K O, *et al.* Detection and molecular characterization of porcine enteric calicivirus in Korea, genetically related to sapoviruses [J]. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2006, 53(4): 155 - 159.
- [4] Mijovski J Z, Poljak-Prijatelj M, Steyer A, *et al.* Detection and molecular characterisation of noroviruses and sapoviruses in asymptomatic swine and cattle in Slovenian farms [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2010, 10(3): 413 - 420.
- [5] L'Homme Y, Sansregret R, Plante-Fortier E, *et al.* Genetic diversity of porcine Norovirus and Sapovirus: Canada, 2005 - 2007 [J]. *Arch Virol*, 2009, 154(4): 581 - 593.
- [6] Oka T, Yamamoto M, Katayama K, *et al.* Identification of the cleavage sites of sapovirus open reading frame 1 polyprotein [J]. *Journal of General Virology*, 2006, 87 (Pt11): 3329 - 3338.
- [7] Ansari I H, Nanda S K, Durgapal H, *et al.* Cloning, sequencing, and expression of the hepatitis E virus (HEV) nonstructural open reading frame 1 (ORF1) [J]. *J Med Virol*, 2000, 60(3): 275 - 283.
- [8] Fullerton SW, Blaschke M, Coutard B, *et al.* Structural and functional characterization of sapovirus RNA-Dependent RNA polymerase [J]. *J Virol*, 2007, 81(4): 1858 - 1871.
- [9] Agrawal S, Gupta D, Panda S K. The 3' end of hepatitis E virus (HEV) genome binds specifically to the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) [J]. *Virology*, 2001, 282(1): 87 - 101.
- [10] Panda S K, Ansari I H, Durgapal H, *et al.* The in vitro-synthesized RNA from a cDNA clone of hepatitis E virus is infectious [J]. *J Virol*, 2000, 74(5): 2430 - 2437.

- [11] Zhang W, Shen Q, Hha X, *et al.* The first Chinese porcine sapovirus strain that contributed to an outbreak of gastroenteritis in piglets [J]. *J Virol*, 2008, 82 ( 16 ): 8239 – 8240.
- [12] 靳 森, 虞结梅, 李慧莹, 等. 中国河北省卢龙地区猪札幌病毒的基因多样性[J]. *病毒学报*, 2010, 26 ( 3 ): 255 – 259.
- [13] Shen Q, Zhang W, Yang S, *et al.* Molecular detection and prevalence of porcine caliciviruses in eastern china from 2008 to 2009 [J]. *Arch Virol*, 2009, 154 ( 10 ): 1625 – 1630.
- [14] 黄泽彬, 余兴龙, 李润成, 等. 首次从国内鉴定到猪肠道杯状病毒及其分子流行病学调查[J]. *中国人畜共患病学报*, 2009, 25 ( 7 ): 623 – 626.
- [15] Farkas T, Zhong W M, Jing Y, *et al.* Genetic diversity among Sapoviruses [J]. *Arch Virol*, 2004, 149 ( 7 ): 1309 – 1323.
- [16] 郭容利, 倪艳秀, 温立斌, 等. 猪传染性胃肠炎病毒江苏株的分离与鉴定及其 S 基因序列分析[J]. *华北农学报*, 2013, 28 ( 5 ): 74 – 79.
- [17] Guo M, Chang K O, Hardy M E, *et al.* Molecular characterization of a porcine enteric Calicivirus genetically related to Sapporo-like human Caliciviruses [J]. *J Virol*, 1999, 73 ( 11 ): 9625 – 9631.
- [18] 刘善荣, 刘厚奇, 戚中田, 等. 蛋白激酶与蛋白磷酸酶在细胞增殖分化中的机制研究[J]. *第二军医大学学报*, 2004, 25 ( 5 ): 550 – 552.
- [19] Nakamura K, Someya Y, Kumasaka T, *et al.* A norovirus protease structure provides insights into active and substrate binding site integrity [J]. *J Virol*, 2005, 79 ( 21 ): 13685 – 13693.
- [20] Zeitler C E, Estes M K, Venkataram Prasad B V. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus protease at 1.5-Å resolution [J]. *J Virol*, 2006, 80 ( 10 ): 5050 – 5058.
- [21] Hansen J L, Long A M, Schultz S C. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus [J]. *Structure*, 1997, 5 ( 8 ): 1109 – 1122.