

猪繁殖与呼吸综合症病毒分子生物学研究进展

韦祖樟 孙 志 袁世山*

(中国农业科学院 上海兽医研究所/中国动物卫生与流行病学中心上海分中心 动物传染病防治研究室
农业部动物寄生虫病重点实验室 上海 200232)

摘 要: 猪繁殖与呼吸综合症病毒是引起猪繁殖与呼吸综合症的病原体, 本文对 PRRSV 的基因组结构、病毒的非结构蛋白和结构蛋白的及其功能的分子生物学研究进展做了简要综述。

关键词: 猪繁殖与呼吸病毒, 分子生物学, 动脉炎病毒

Current Advances on Molecular Biology of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

WEI Zu-Zhang SUN Zhi YUAN Shi-Shan*

(Department of Animal Infectious Diseases, Shanghai Veterinary Research Institute, China Academy of Agricultural Sciences, The Key Laboratory of Animal Parasitology, Chinese Ministry of Agriculture, Shanghai 200232)

Abstract: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) is the etiological agent of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. We summarized the recent research progress on molecular biology of PRRSV including the structure of genome, viral structural and Non-structural protein.

Keywords: PRRSV, Molecular biology, Arterivirus

猪繁殖与呼吸综合症病毒(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus, PRRSV)与马动脉炎病毒(Equine Arteritis virus, EAV)、小鼠乳酸脱氢酶升高症病毒(Lactate dehydrogenase-elevating virus, LDV)、以及猴出血热病毒(Simian hemorrhagic fever virus, SHFV)同属于动脉炎病毒属(Arterivirus), 动脉炎病毒科(arteriviridae), 套式(又称“巢状”)病毒目(Nidovirales)。猪繁殖与呼吸综合症(PRRS)是 PRRSV 引起的一种危害严重的接触性传染病, 俗称“蓝耳病”(Blue-eared Disease)。根据血清型和遗传特性的差异, 可将 PRRSV 划分为两个基因型

(Genotype), 即欧洲()型(代表株 Lelystad virus, LV)和美洲()型(代表株 VR 2332)。前者主要流行于欧洲地区, 而后者主要流行于美洲和亚太地区^[1]。该病于上个世纪 80 年代后期在美国首先被发现^[2], 随后相继在世界各国报道。1996 年我国郭宝清等人首次从国内 PRRS 血清阳性猪群中分离到 PRRSV, 证实了我国也有该病的流行^[3]。由于没有有效的防治手段, PRRS 在国内预演愈烈, 直接和间接地造成了 2006 年流行我国大部分省份的所谓“猪无名高热”, 又称“猪高热综合症”^[4]。据粗略估计, 后者 2006 年导致 1000 万 - 3000 万头生猪死亡。PRRS 及

并发症防而不止的原因在于对PRRSV的复制过程及致病分子机理不尽清楚。本文试图对当前PRRSV分子生物学研究进展做一概述,以期从根本上有针对性地防控PRRS进行理性思考。

1 PRRSV 基因组的结构

PRRSV基因组为不分节段的单股正链RNA,全长约15kb,具有5'端帽状结构和3'poly(A)尾。其5'非编码区(又称非翻译区, untranslated region, 5'UTR)长为189-222核苷酸(nucleotide, nt), 3'末端UTR长约110nt - 150nt。蛋白编码区包含至少8个部分首尾重叠的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF), 近5'端占基因组总长3/4的ORF1编码包括RNA依赖性RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)等具有病毒复制与转录功能非结构蛋白(Non-Structural Proteins, Nsp), 合称复制酶(replicase)和转录酶(transcriptase)复合体(Complex)。ORF1可进一步划分为ORF1a和ORF1b, ORF1a所编码的复制酶多肽(polyprotein, pp)pp1a具有蛋白水解酶功能, 位于下游的ORF1b采用-1核糖体移码(-1 ribosomal frameshifting)机制的表达多聚蛋白pp1ab。据信, 有两个信号促使核糖体移码的发生, 第1个信号是滑动序列(slippery sequences), 即-1核糖体的移码位点, 在PRRSV, 这个移码位点一般为GUUUAAAC, 紧跟其后的就是ORF1a的终止密码子(AUG); 第2个信号位于滑动序列下游的RNA假扣结构(RNA pseudoknot structure)。在EAV系统中, 这两个信号是RNA聚合酶翻译过程中-1核糖体移码所必需的, PRRSV的移码信号尚需试验验证。基因组近3'端至少有6个开放阅读框架编码病毒的结构蛋白, 结构蛋白的表达需要通过非连续性转录(discontinuous transcription)产生至少6个亚基因组mRNA(subgenomic mRNA, sgmRNA)。sgmRNA与mRNA1(亦即病毒基因组RNA, vRNA)共享5'UTR、3'UTR以及poly(A)。感染细胞中的RNA组分按大小排列为mRNA1-7。除ORF7外, mRNA在结构上呈现为多顺反子(polycistronic), 即每一个下游ORF序列都存在于上游ORF的mRNA分子中。但除mRNA2之外, 每一条mRNA在功能上表现为单顺反子(monocistronic), 即只有位于最上游的ORF可以从一条mRNA中表达, 而mRNA2因同时编码ORF2a和ORF2b, 则呈现为双顺反子(dicistronic)。动脉炎病毒

的5'UTR存在于每条mRNA上游的ORF前, 故又称为前导序列(Leader)。PRRSV Leader 3'末端最后6个碱基为病毒种特异性保守序列(5'-UUAACC-3'), 称为前导序列连接位点(leader junction site, LJS)。这一保守序列同时存在于基因组中下游的每个ORF之前, 每个下游的5'-UUAACC-3'被相应地称为编码体序列连接位点(body junction site, BJS)。5'UTR的LJS与下游的每个ORF前的BJS的相互配对, 从而介导leader与下游序列的非连续性跳跃(jumping)连接。非连续性连接产生的是mRNA, 因此这个过程实际上是病毒基因的转录, 即所谓的“非连续性转录”^[1]。因其参与调节转录过程, 故这个六碱基保守序列称为“转录调控序列”(transcription-regulating sequence, TRS)或者转录启动子(transcriptional promoter)。

2 PRRSV 非结构蛋白及其功能

ORF1a和ORF1b分别编码具有病毒的复制酶和RNA聚合酶功能的两个多聚蛋白pp1a和pp1ab, pp1a和pp1ab被ORF1a编码的蛋白水解酶加工成12个推测的非结构蛋白(Non-structure protein, Nsp)。ORF1a编码具有多肽蛋白切割功能的蛋白水解酶。其中Nsp1具有木瓜蛋白酶样半胱氨酸蛋白酶活性(papain-like cysteine proteinase, PCP), 它能介导自身从多聚蛋白中切割出来。Nsp1包括PCP1a、PCP1、锌指(zinc finger, ZF)等3个结构域, PCP1a能快速释放N端的切割产物(Nsp1a), 接着PCP1切割Nsp1/Nsp2位点, 使Nsp1从多聚蛋白中释放出来。PCP1a催化位点是Cys75/His146, 但Nsp1a/Nsp1之间具体切割位点还没有定论。PCP1的催化位点分别为Cys276/His345和Cys269/His340, 其切割位点为Tyr384/Gly385。虽然Nsp1具有ZF结构域, 但其具体功能还没有确定^[5]。Nsp2具有半胱氨酸蛋白酶(cysteine proteinase, CP2)活性^[6], 介导Nsp2/Nsp3切割。CP2位于Nsp2 N端结构域中, 在EAV, CP2催化位点为Cys271和His332, 切割位点在Gly831/Gly832, 此催化位点和切割位点在所有动脉炎病毒中是高度保守的。Nsp2在各基因型中和同一基因型之间变异很大。欧洲型PRRSV Nsp2在734-750位氨基酸之间有一段17个氨基酸的缺失区, 同为北美洲型的HB-2株、BJ-4株、VR2332株和cH-1a株, 其Nsp2的氨基酸序列同源性在78.3%~88.9%之间^[7]。而且

Nsp2 蛋白具有耐受碱基插入或缺失的能力。HB-2 株在该区存在 12 个氨基酸缺失现象, MN184 的 Nsp2 缺失 100 多个氨基酸, 而 sp184212 株的 Nsp2 区插入了 30 多个氨基酸^[8,9]。因此 Nsp2 可用于监测 PRRSV 的变异的独特标记。2006 年 - 2007 年我国大部分省份发生猪高热综合症, 从中分离到变异的 PRRSV, 根据动物回归实验, 从“高热病”分离的 PRRSV 变异毒株为高致病性毒株^{[10][11]}。遗传进化分析发现高致病的 PRRSV Nsp2 存在特异 30 多个氨基酸缺失, 推测 Nsp2 为高致病性 PRRSV 的毒力因子^[11], 但是目前还没有任何实验证明。本实验室先后建立了非毒力的 PRRSV 感染性克隆 pCBC2 和高致病的 HP PRRSV 感染性克隆(未发表)。目前正对强、弱毒株的感染性克隆的非编码区以及各个结构蛋白和非结构蛋白进行相互替换。特别是对 Nsp2 各个结构域进行系列缺失和突变, 从而剖析 Nsp2 对病毒复制和转录中作用。有趣的是, Nsp2 作为一个多功能的蛋白, 除了本身作为半胱氨酸蛋白酶进行自身的水解加工以外, 该蛋白还存在多个具有高免疫原性的 B 细胞表位^[12,13], 针对这些表位的抗体能够在感染一周内检测到。这些免疫表位在免疫应答中的作用还需进一步研究。NSP4 具有 3C 样丝氨酸蛋白酶活性 (3C-like serine proteinases, 3CLSP), EAV 3CLSP 是目前研究相对比较透彻的主要蛋白酶^[14,15]。X-射线晶体结构显示 3CLSP 折叠成两个 β -桶结构。 β -桶结构含有 1 个催化中心(His-1104/Asp-1130/Ser-1185)和 1 个底物连接袋(substrate-binding pocket)构成了典型 3C 样丝氨酸蛋白酶活性的催化结构域。在 EAV 复制酶中, 3CLSP 在 pp1ab 多聚蛋白中至少有 8 个切割位点, 其中 5 个在 ORF1a 的 C 端, 3 个在 ORF1b 编码的多肽中。有 4 个切割位点是为 Glu/Gly, 3 个是 Glu/Ser, 而另一个则是 Gln/Ser, 这些切割位点在所有动脉炎病毒中都是保守的。3CLSP 将 ORF1b 编码的多肽 pp1ab 切割成 Nsp9、Nsp10、Nsp11、Nsp12 等 4 个非结构蛋白, 这些蛋白形成复制酶复合体 (Replicase Complex), 同步完成动脉炎病毒基因组的复制和亚基因组转录。Nsp9 具有 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 活性, RdRp 结构域是 RNA 的复制和转录的引擎。Nsp10 由其 C 端的超家族 1 (superfamily1, SF1) 解旋酶 (helicase, Hel) 结构域和 N 端锌结合结构域 (zinc-binding domain, ZBD) 组成^[16], 具有 ATP 酶

(ATPase) 和解旋酶活性。锌结合结构域对解旋酶功能的行使是必需的^[17], 因为 ZBD 中的单个残基的替代或整个结构域的缺失可致 Nsp10 功能失活, 而且失活的 Nsp10 功能不能被野型 ZBD 反式互补 (in trans), 说明 ZBD 在 Nsp10 也起到顺式 (in cis) 调控功能的作用。故可以推测 ZBD 通过某种未知的机制调节解旋酶活性, 在 PRRSV 的复制和转录中起着关键作用。Nsp11 具有套式病毒特异的核糖核酸内切酶 (Nidovirus-specific endoribonuclease, Nendo U) 功能蛋白结构域。NendoU 是套式病毒 (Nidovirales) 复制酶 C 端的最保守区域, 在冠状病毒中, NendoU 是 Mn^{2+} 依赖性的, 能产生 2' - 3' 环状磷酸化末端和切割 GU 或 GUU 序列中的尿苷酸, 具有催化作用的 3 个残基 (His-162, His-178, and Lys-224) 在所有的 NendoU 家族中是绝对保守的。目前还没有实验证明动脉炎病毒 Nsp11 是否具有核糖核酸内切酶的活性, 但是冠状病毒 NendoU 活性所需的所有残基在动脉炎病毒中是保守的, 这表明 Nsp11 可能有这种生物学活性。在 EAV 对 NendoU 结构域进行点突变和部分缺失, 对病毒的复制和亚基因组转录以及感染性病毒的产生都有不同程度的影响^[16,18]。

3 PRRSV 结构蛋白及其功能

PRRSV 共有 7 个结构蛋白。ORF2a、ORF2b、ORF3 和 ORF4 分别编码 GP2a、GP2b、GP3、GP4 等小囊膜蛋白。ORF5、ORF6 和 ORF7 分别编码病毒主要囊膜蛋白 GP5、膜基质蛋白 M 和核衣壳蛋白 N。GP2a 与 GP4 的分子量分别为 29 kD - 30 kD 和 30 kD—35 kD 的型整合膜蛋白, N 端有一段信号肽序列, C 端锚定在膜上, 蛋白表面分别有 2 和 4 个 N-糖基化位点^[19]。GP3 分子量为 45 kD - 50 kD, 是一个高度糖基化蛋白, 有 7 个 N-糖基化位点。GP3 是 EAV 和欧洲型 PRRSV 病毒颗粒组成成分, 而北美型 PRRSV, GP3 是否为结构蛋白还存在争议^[20]。小囊膜蛋白 E (GP2b) 是最近才鉴定出来的结构蛋白组分, GP2b 由 mRNA2 中的第 6 个碱基开始的内部 ORF2b 编码。在北美和欧洲株 PRRSV 中, E 蛋白分别由 73 和 70 个氨基酸组成, 分子量为 10 kD, 没有糖基化位点, 在 N 端有 1 个肉豆蔻基化位点和 1 个酪蛋白磷酸化位点。E 蛋白含有 2 个半胱氨酸 (cys48 和 cys54), 但 E 蛋白不能形成二硫键连接的同源二聚体。蛋白高度疏水, 在疏水的 C 端结构域有一段碱性

的氨基酸,在胞内与膜连接。据报道该蛋白镶嵌在病毒囊膜中可能起到有离子通道的作用,在感染过程促进病毒的脱壳而把基因组释放到细胞浆中^[21]。E蛋白可以与GP2-GP3-GP4蛋白三聚体相互作用,形成的异聚多亚基对病毒的感染起到关键的作用。

病毒粒子表面主要囊膜蛋白由非糖基化的M蛋白和GP5组成^[22]。PRRSV GP5和M蛋白的拓扑结构还没有弄清楚,但是通过与已知拓扑结构的LDV GP5和M蛋白同源比较可以推断,M蛋白为18 kD - 19 kD型跨膜蛋白,蛋白跨膜3次,膜外结构域(ectodomain)由13 - 18个氨基酸组成,膜内结构域由81 - 87个氨基酸组成。GP5分子量约为25 kD,其结构与M蛋白非常相似,其N端是有一段32个氨基酸组成的可切割的信号肽,引导蛋白形成3次跨膜结构,膜外结构域由30个氨基酸组成。C端的膜内结构域(endodomain)有50 - 72个氨基酸。将大量不同毒株的PRRSV GP5蛋白的氨基酸和核苷酸序列进行比较发现GP5有1个高变异区(aa32-40)、2个多变区(aa57-70和aa121-130)、3个保守区(aa41-56,aa71-120,aa131-200)和多个糖基化位点,第1个糖基化位点位于GP5膜外结构域的高变区(32 - Asn或33-Asn或34-Asn),但这一位点只是在部分的毒株存在。第2和第3个潜在的糖基化位点位于残基44-Asn和55-Asn(北美株PRRSV)或者位于残基46-Asn和53-Asn(LV PRRSV)。除了这3个糖基化位点外,一些北美毒株如VR2323和IAK-Klop还有第4个糖基化位点。因此在PRRSV病毒粒子表面有2 - 4个糖基化位点,目前在还没有鉴定病毒粒子表面GP5有几个位点被糖基化,研究表明N-多糖对病毒糖蛋白的折叠和功能起到重要的作用。将PRRSV(LV株)GP5蛋白的N46位糖基化位点进行突变,对病毒的颗粒的产生和病毒粒子的感染性都有很大的影响。其原因可能是没有了寡糖导致了GP5蛋白不能正确折叠,病毒与受体的相互作用减弱,降低了病毒的特异的感染性。对北美型PRRSV进行反向遗传操作,对GP5膜外结构域的3个N-糖基化位点(N34、N44、N51)进行突变。分析发现N44突变能导致全长cDNA不能拯救出病毒,N33、N55、N33/N55突变使病毒的生长滴度降低,而且突变的病毒对抗体的敏感性增强,突变病毒感染猪比野毒株产生更高水平的抗体,这表明GP5膜外区的多糖

的缺失能够提高病毒对抗体的中和能力和其附近中和表位的免疫原性^[23]。因此GP5蛋白的N-糖基化对病毒组装和诱导中和抗体有着重要的影响。肽段图谱(peptide mapping)显示PRRSV的中和表位在GP5膜外结构域的(aa36-52)之间,用猪多克隆抗血清和单克隆抗体鉴定了GP5有1个非中和表位A和1个中和表位B。表位B可以被单克隆中和抗体和高滴度抗PRRSV血清识别,但不能被非中和猪血清中和。中和表位B包括aa37-45,这几个氨基酸在所有毒株中都是保守的,但是表位B不是免疫优势表位(immunodominant)。非中和表位A(aa27-30)具有高变异性,却为免疫优势表位。感染病毒的猪首先产生抗表位A的抗体,而后才产生中和表位的B抗体。因此认为表位A可以作为一个诱饵(decoy),从而使中和抗体产生延迟^[24]。虽然目前还没有明确PRRSV的免疫逃避机制,存在于表位B周围的N-多糖能够降低GP5中和决定簇的免疫原性,这一点与PRRSV对鼠的低免疫原性和鼠不能对病毒产生高水平的中和抗体是一致的。PRRSV的主要抗原定位于GP5蛋白的N-端,蛋白的内在特性如诱饵表位和不同种类的糖基化使关键的中和位点变得不明显,从而阻止并降低了与中和抗体的反应^[25]。

N蛋白是一种碱性磷酸蛋白,分子量为15 kD,N蛋白占病毒子蛋白总量的40%^[26]。在北美型PRRSV中N蛋白由123个氨基酸组成,而欧洲型PRRSV的N蛋白有128个氨基酸。N蛋白构成病毒的主要抗原,免疫原性极强,其主要的抗原决定簇主要分布在蛋白的中央。研究表明N蛋白的主要抗原决定簇为构象型表位,其C端氨基酸可形成稳定的折叠,对维持N蛋白的抗原性是必需的^[27,28]。N蛋白与病毒基因组RNA相连,其主要功能是基因组包装(encapsidation),N蛋白以共价和非共价的方式自身相互作用是病毒核蛋白组装的基础^[29]。N蛋白在细胞浆中合成后,其通过非共价连接的形式与自身结合,当N蛋白转运到内质网腔和高尔基体,N-N之间的通过二硫键连接形成同源二聚体N蛋白,接着组装成病毒衣壳。北美株的PRRSV N蛋白含有3个保守的半胱氨酸,即Cys23、Cys75、Cys90。通过分析突变表达的N蛋白发现,N-N通过Cys23之间的共价连接形成同源二聚体,并且N蛋白的Cys-23对基因组复制和病毒感染性是必须的。但是N蛋白的半胱氨酸在动脉炎病毒之间不保守,在欧洲株的PRRSV

和LDV含有两个半胱氨酸,而在EAV和SHFV,N蛋白是没有半胱氨酸,因此动脉炎病毒的N蛋白二聚体化的生物学意义还是有待进一步研究。在病毒感染初期N蛋白主要集中在感染细胞核的周围区域,但也有报道N蛋白在感染细胞核和核仁中的聚积^[30]。研究表明,N蛋白中含有类似于核定位信号(nuclear localization signal, NLS)的保守的碱性决定簇,这段序列与经典类型Pat7 " NLS有高度同源性。N蛋白的Pat7 基序为PGKKKNKK,位于41—47氨基酸之间。核定位信号可与输入蛋白 α 和 β (importin- α 和 β)相互作用。因此N蛋白的核定位是通过NLS - 依赖的由输入蛋白 α 和 β 介导的核转运途径实现的。N蛋白的核定位不需要N-N二硫键连接的二聚体形成,一旦N蛋白进入细胞核,蛋白可以特异的与小核仁RNA连接的纤维蛋白相互作用,并且N蛋白能够结合28S和18S rRNA,推测N蛋白与核糖体的生物发生(biogenesis)有关。将NLS位点中的43和44的K替换为G,突变的NLS PGGGNKK能够限制N蛋白在细胞浆中,将失效的NLS(NLS-null)导入全长的感染性cDNA中,转染细胞后,NLS-null感染性克隆能导致细胞病变和产生感染性病毒粒子,但是NLS-null病毒的生长滴度比野毒株低100倍。将NLS-null病毒感染猪,猪体内存在时间较短的病毒血症,但是病毒却能产生较高的中和抗体。在持续感染猪体扁桃体发现NLS-null NLS能够突变为41 - PGRGNKK和41 - PGGRNKK,产生的回复突变株能使突变的N蛋白转运到细胞核。这暗示N蛋白的NLS位点有着很强的选择压力,NLS-null NLS回复突变为功能的NLS表明病毒的持续感染与病毒N蛋白核定位有关^[32]。

4 结语

随着分子生物学和分子免疫学的学科的飞速发展,对PRRSV结构和功能的研究正在不断的深入。然而目前对PRRSV蛋白的结构与功能的研究有待加强,基因组复制与转录的调控机制和病毒的致病与持续感染机制等仍有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Eric J Snijder, Janneke JM Meulenberg. The molecular biology of arteriviruses. *Journal of General Virology*, 1998, **79**(pt5): 961-979.
- [2] Keffaber KK. Reproductive failure of unknown etiology. *Am Assoc SwinePrac News*, 1989, **1**: 1-9.
- [3] 郭宝清. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离猪生殖和呼吸综合征病毒(PRRSV)的研究. *中国畜禽传染病*, 1996, **2**: 1-3.
- [4] 万遂如. 猪无名高热综合征. *养殖和饲料*, 2006, **10**: 14-17.
- [5] Johan A, Den Boon, Kats Faaberg, *et al.* Processing and Evolution of the N-Terminal Region of the Arterivirus Replicase ORF1a Protein: Identification of Two Papainlike Cysteine Proteases. *Journal of Virology*, 1995, **69**(7): 4500-4505.
- [6] Snijder EJ, Wassenaar AL. The arterivirus Nsp2 protease An unusual cysteine protease with primary structure similarities to both papain-like and chymotrypsin-like proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, **270**(28): 16671-16676.
- [7] Shen S, Kwang J, Liu W, *et al.* Determination of the complete nucleotide sequence of a vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and identification of the Nsp2 gene with a unique insertion. *Arch Virol*, 2000, **145**(5): 871-883.
- [8] 高志强, 郭鑫, 杨汉春, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒缺失变异株的基因组特征. *畜牧兽医学报*, 2005, **36**(6): 578-584.
- [9] Han J, Liu G, Wang Y, *et al.* Identification of Nonessential Regions of the nsp2 Replicase Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain VR-2332 for Replication in Cell Culture. *J Virol*, 2007, **81**(18): 9878-9890.
- [10] Kegong Tian, Xiuling Yu, Tiezhu Zhao, *et al.* Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PLoS one*, 2007, **13**(2): e526.
- [11] Tong GZ, Zhou YJ, Hao XF, *et al.* Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China [letter]. *Emerg Infect Dis*, 2007, **9**.
- [12] De Lima M, Pattnaik AK, Flores EF, *et al.* Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes of Nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, 2006, **353**(2): 410-421.
- [13] Yan Y, Guo X, Chen Y, *et al.* Monoclonal antibody and porcine antisera recognized B-cell epitopes of Nsp2 protein of a Chinese strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus res*, 2007, **126**(1-2): 207-215.
- [14] Snijder EJ, Wassenaar AL, van Dinten, *et al.* The arterivirus nsp4 protease is the prototype of a novel group of chymotrypsin-like enzymes, the 3C-like serine proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, **271**(9): 4864-4871.
- [15] Danny van Aken, Willemien E Benckhuijsen, Jan W, *et al.* Expression, purification, and in vitro activity of an arterivirus main proteinase. *Virus Research*, 2006, **120**(1-2): 97-106.
- [16] Alexander E Gorbalenya, Luis Enjuanes, John Ziebuhr, *et al.*

- a *Nidovirales*: Evolving the largest RNA virus genome. *Virus Research*, 2006, **117**(1): 17–37.
- [17] Elida M Bautista, Kay S Faaberg, Dan Mickelson, *et al.* Functional Properties of the Predicted Helicase of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Virus Virology*, 2002, **298**(2): 258–270.
- [18] Clara C Posthuma, Danny D, Nedialkova, *et al.* Site-Directed Mutagenesis of the Nidovirus Replicative Endoribonuclease NendoU Exerts Pleiotropic Effects on the Arterivirus Life Cycle. *Journal of Virology*, 2006, **80**(4): 1653–1661.
- [19] Mardassi HP, Gonin CA, Gagnon B Massie. A subset of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP3 glycoprotein is released into the culture medium of cells as a non-virion-associated and membrane-free (soluble) form. *Journal of Virology*, 1998, **72**(8): 6298–6306.
- [20] Wai-Hong Wu, Ying Fang, Raymond RR Rowland, *et al.* The 2b protein as a minor structural component of PRRSV. *Virus Research*, 2005, **114**(22): 177–181.
- [21] Changhee Lee, Dongwan Yoo. The small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus possesses ion channel protein-like properties. *Virology*, 2006, **355**(1): 30–43.
- [22] Udeni BR Balasuriya, N James MacLachlan. The immune response to equine arteritis virus: potential lessons for other arteriviruses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2004, **102**(3): 107–129.
- [23] Israrul H Ansari, Byungjoon Kwon, Fernando A. Osorio. Influence of N-Linked Glycosylation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP5 on Virus Infectivity, Antigenicity, and Ability to Induce Neutralizing Antibodies. *Journal of Virology*, 2006, **80**(8): 3994–4004.
- [24] M Ostrowski, JA Galeota, AM Jar, *et al.* Identification of Neutralizing and Nonneutralizing Epitopes in the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP5 Ectodomain. *Journal of Virology*, 2002, **76**(13): 4241–4250.
- [25] Peter L Delputte, Hans J Nauwynck. Porcine Arterivirus Infection of Alveolar Macrophages Is Mediated by Sialic Acid on the Virus. *Journal of Virology*, 2004, **78**(15): 8094–8101.
- [26] Sarah K Wootton, Raymond RR Rowland, Dongwan Yoo. Phosphorylation of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nucleocapsid Protein. *Journal of Virology*, 2002, **76**(20): 10569–10576.
- [27] Meulenberg JJM, AP van Nieuwstadt, A van Essen-Zandbergen, *et al.* Localization and fine mapping of antigenic sites on the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with monoclonal antibodies. *Virology*, 1998, **252**(1): 106–114.
- [28] Wootton SG, Koljesar L Yoon, D Yoo. Antigenic importance of the carboxy-terminal beta-strand of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001, **8**(3): 598–603.
- [29] Wootton SK, D Yoo. Homo-oligomerization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein and the fold of disulfide linkages. *Journal of virology*, 2003, **77**(8): 4546–4557.
- [30] Rowland RR, R Kervin, C Kuckleburg, *et al.* The localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus of infected cells and identification of a potential nucleolar localization signal sequence. *Virus Research*, 1999, **64**(1): 1–12.
- [31] Raymond RR Rowland, Dongwan Yoo. Nucleolar-cytoplasmic shuttling of PRRSV nucleocapsid protein: a simple case of molecular mimicry or the complex regulation by nuclear import, nucleolar localization and nuclear export signal sequences. *Virus Research*, 2003, **95**(1-2): 23–33.
- [32] Changhee Lee, Douglas Hodgins, Jay G Calvert, *et al.* Mutations within the nuclear localization signal of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein attenuate virus replication. *Virology*, 2006, **346**(1): 238–250.