

## 研究报告

## 与 PRRSV nsp11 互作的宿主细胞蛋白鉴定及生物信息学分析

靳换 李逸 姜楠 周磊 盖新娜 杨汉春 郭鑫\*

(中国农业大学动物医学院 农业部动物流行病学重点实验室 北京 100193)

**摘要:**【目的】研究猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) nsp11 与宿主细胞蛋白之间的相互作用, 对于揭示 nsp11 在病毒复制过程中发挥的功能至关重要。【方法】在病毒感染细胞的基础上, 利用 nsp11 的单克隆抗体, 采用免疫沉淀结合串联质谱的方法, 筛选与 PRRSV nsp11 相互作用的宿主细胞蛋白, 并对所筛选出的宿主细胞蛋白进行了 GO 注释、COG 注释和 KEGG 代谢通路注释; 选取筛选出的宿主细胞蛋白 IRAK1, 利用免疫共沉淀技术和激光共聚焦技术鉴定其与 nsp11 之间的相互作用。【结果】与空白对照组相比, 病毒感染组中出现 3 条差异带; 经质谱分析共筛选得到了 201 个与 nsp11 相互作用的宿主细胞蛋白, 分别与蛋白质代谢、细胞信号通路转导以及病原致病性等密切相关; 在生物信息学分析的基础上, 实验验证了 nsp11 确与宿主细胞蛋白 IRAK1 进行相互作用。【结论】鉴定出与 PRRSV nsp11 相互作用的宿主细胞蛋白, 生物信息学分析显示它们在病毒的复制和致病过程中发挥重要作用。研究结果为探究 nsp11 的生物学功能指明了方向, 也为研究宿主细胞蛋白与病毒蛋白间的相互作用及其调控病毒复制和致病性的分子机制奠定了基础。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒, 非结构蛋白 11, 宿主细胞蛋白, 相互作用, 生物信息学分析

## Identification and bioinformatics analysis of host cellular proteins interacting with PRRSV nsp11

JIN Huan LI Yi JIANG Nan ZHOU Lei GE Xin-Na YANG Han-Chun GUO Xin\*

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Key Laboratory of Animal Epidemiology of Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China)

**Abstract:** [Objective] Exploring the interaction between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) nsp11 and host cellular proteins is important for revealing the function of nsp11 in viral replication. [Methods] The host cellular proteins that interact with nsp11 were screened by immunoprecipitation combined tandem mass spectrometry and analyzed by GO annotation, COG annotation as well as KEGG pathway annotation. The screened host cell protein IRAK1 was selected, and then the interaction between nsp11 and IRAK1 was determined by co-immunoprecipitation and confocal microscopy assays. [Results] Compared with the control group, there were 3 differential

**Foundation item:** National Key Technologies R&D Program of China (No. 2015BAD12B01-2)

\*Corresponding author: Tel: 86-10-62732875; E-mail: guoxin@cau.edu.cn

Received: July 15, 2017; Accepted: September 18, 2017; Published online (www.cnki.net): September 26, 2017

基金项目: 国家科技攻关计划项目(No. 2015BAD12B01-2)

\*通讯作者: Tel: 86-10-62732875; E-mail: guoxin@cau.edu.cn

收稿日期: 2017-07-15; 接受日期: 2017-09-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-09-26

bands in PRRSV-infected group and 201 host cellular proteins were identified on these differential bands by further LC-MS/MS analysis. These host cellular proteins are closely related to protein metabolism, transduction of cell signaling pathways and pathogenicity of pathogens. Based on the bioinformatics analysis, host cellular protein IRAK1 was identified to interact with the nsp11. **[Conclusion]** This study identified the host cellular proteins that can interact with PRRSV nsp11, and bioinformatics analysis showed that these proteins play crucial role in virus replication and pathogenesis. The results indicate the direction of the study of nsp11, and also provide a foundation for elucidating the associated molecular mechanisms of the interaction of host cellular proteins with viral proteins in regulating the viral replication and pathogenesis.

**Keywords:** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), Non-structural protein 11 (nsp11), Host cellular proteins, Interaction, Bioinformatics analysis

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的猪的一种高度接触性传染病,临床上主要表现为妊娠母猪流产、早产、产死胎和木乃伊胎等繁殖障碍以及各生长阶段猪(特别是仔猪)的呼吸道症状<sup>[1-2]</sup>。1987年,该病首次在美国北卡罗纳州、爱荷华等州发现,随后该病迅速蔓延,在北美、欧洲和亚洲等地相继暴发和流行,给全球养猪业造成了巨大经济损失<sup>[3-5]</sup>。1991年,在中国台湾地区首次暴发 PRRS<sup>[6]</sup>;1996年郭宝清等首次分离到 PRRSV (CH-1a 株),从而确证中国大陆存在 PRRS<sup>[7]</sup>。2006年,我国出现高致病性 PRRSV (Highly pathogenic PRRSV)<sup>[8]</sup>,造成大批猪死亡,此次疫情严重危害了我国养猪生产。PRRSV 的致病机制非常复杂,其中非结构蛋白在调节病毒的复制和致病性以及拮抗宿主抗病毒免疫调控中发挥重要作用<sup>[9-12]</sup>。PRRSV 非结构蛋白 nsp11 具有特异性切割嘧啶碱基的核糖核酸内切酶活性、去泛素化酶活性,可抑制 I 型干扰素、IRF3 和 NF- $\kappa$ B 激活<sup>[13-15]</sup>以及抑制细胞因子 IL-1 $\beta$  的产生<sup>[16]</sup>。

鉴定宿主细胞蛋白与病毒蛋白之间的相互作用是研究病毒蛋白的功能以及在复制过程中作用的关键步骤<sup>[17-18]</sup>。Gene Ontology (简称 GO)是生物信息领域中一个极为重要的方法和工具,通过建立一套具有动态形式的控制字集,预测真核基因及蛋白质在细胞内所扮演的角色,从而全面描述生物体

中基因和基因产物的属性<sup>[19]</sup>; Clusters of Orthologous Groups of proteins (简称 COG)注释的作用主要是通过参考 NCBI 数据库中已知的蛋白对未知序列进行功能注释;在生物体内,不同蛋白相互协调而行使其生物学功能,基于 Pathway 的分析有助于更进一步了解其生物学功能。Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (简称 KEGG)是有关 Pathway 的主要公共数据库<sup>[20]</sup>,通过 Pathway 分析能确定宿主蛋白质参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。为了探究 PRRSV nsp11 的生物学功能以及 nsp11 在病毒复制和致病性过程中所发挥的作用,本研究以 nsp11 与宿主细胞蛋白的相互作用为切入点,通过筛选和鉴定与 nsp11 相互作用的宿主细胞蛋白并进行 GO 注释、COG 注释和 KEGG 代谢通路注释,分析预测这些宿主细胞蛋白在病毒的复制和致病过程中所发挥的作用,为探究 nsp11 的生物学功能以及 PRRSV 的致病机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞、质粒和病毒:** MARC-145 细胞、真核表达质粒 pCMV-HA 和 pCMV-Myc 由农业部动物流行病学重点开放实验室(以下简称“本实验室”)保存。PRRSV JXwn06 P8 毒株由本实验室分离、鉴定并保存。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** Protein G Sepharose 4 Fast Flow, 购自 GE Healthcare Life Sciences 公司; Alexa-fluor-488 标记的山羊抗鼠 IgG (H+L) F (ab')<sub>2</sub>、

Alexa-fluor-568 标记的山羊抗兔 IgG (H+L) F (ab')<sub>2</sub>、Pierce<sup>TM</sup> Silver Stain for Mass Spectrometry 试剂盒和 Q-Exactive 质谱仪, 购自 Thermo Fisher Scientific 公司; Anti-HA、Anti-Myc 标签单克隆抗体, 购自 Sigma-Aldrich 公司; Anti-IRAK1 多克隆抗体, 购自 Proteintech 公司; Hoechst No. 33258 染色液, 购自北京华菁科技有限公司, Aqua Poly/Mount 试剂, 购自 Polysciences 公司。FluorChem E 化学发光一体机, 购自美国 ProteinSimple 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 质粒的构建:** 分别以 PRRSV 基因组 cDNA 和猪原代肺泡巨噬细胞 cDNA 为模板, 设计引物扩增 nsp11 和 IRAK1 基因, 将获得的基因片段连接至平末端克隆载体 pEASY-Blunt, 通过 PCR 扩增、双酶切、连接的方法, 将 nsp11 和 IRAK1 基因片段分别插入 pCMV-HA 和 pCMV-Myc 载体中, 命名为 pCMV-HA-nsp11 和 pCMV-Myc-IRAK1。设计的引物见表 1。

**1.2.2 银染实验:** 将 SDS-PAGE 蛋白胶用超纯水洗涤 2 次后加入固定液固定 2 次, 用 10% 的乙醇和超纯水各洗涤 2 次, 加入增敏剂孵育 1 min, 洗涤 2 次后加入银染增强液孵育 5 min, 快速洗涤 2 次后加入显影剂, 当蛋白条带显示出后终止反应。根据银染实验结果, 切取差异条带进行质谱分析和鉴定, 详见参考文献[21]。

**1.2.3 质谱分析和鉴定:** 将切取的条带样品脱色完全后冻干, 加入 40  $\mu$ L 胰蛋白酶缓冲液进行酶解, 37  $^{\circ}$ C 16–18 h 将酶解产物通过毛细管高效液相色谱进行脱盐及分离后用质谱仪进行质谱分析和鉴定, 详见参考文献[21]。得到的质谱数据用软件 MASCOT 2.1 和 Proteome Discoverer 1.4 进行查库鉴定及定量分析。

**1.2.4 生物信息学分析:** 分子生物学分析软件包括 LaserGene、DNAMAN、Oligo7 等; 在线分析软件包括 <http://www.geneontology.org>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>; <http://www.kegg.jp/>; <https://string-db.org/>等。

**1.2.5 免疫共沉淀实验:** 将 pCMV-HA-nsp11 和 pCMV-Myc-IRAK1 真核表达质粒共转染 293FT 细胞或者将 PRRSV JXwn06 感染 MARC-145 细胞, 向细胞中加入 IP 细胞裂解液, 使细胞充分裂解, 将裂解上清加入到结合了相应单克隆抗体的 Protein G Sepharose 或者 HA beads 中, 使目的蛋白与结合在 Protein G Sepharose 或者 HA beads 上的抗体充分结合后弃上清。加入 1 $\times$ 蛋白上样缓冲液, 混匀, 沸水煮 5 min, 置于冰上充分冷却, 进行 SDS-PAGE 和 Western blot 实验, 详见参考文献[22]。

**1.2.6 激光共聚焦实验:** 将细胞以合适的浓度接种于铺有无菌爬片的细胞培养板中, 待细胞汇合度达到 60%–70% 时将相应的质粒转染到细胞中, 24 h 后收取样品进行间接免疫荧光实验, 详见参考文献[22]。

## 2 结果与分析

### 2.1 PRRSV 感染宿主细胞过程中 nsp11 表达量变化的分析

为了确定 PRRSV 感染宿主细胞后 nsp11 表达量的变化情况, 用 PRRSV 感染 MARC-145 细胞, 并于感染后 12、24、36、48 和 60 h 收取细胞样品, 与 nsp11 单克隆抗体反应并进行 Western blot 分析, 以  $\beta$ -actin 作为内参对照。实验结果显示, PRRSV 感染后 36 h 到 48 h nsp11 的表达量最高(图 1), 因此选择 36 h 作为筛选与 nsp11 互作宿主细胞蛋白的时间点。

表 1 真核表达载体构建所用引物列表  
Table 1 Primers for construction of eukaryotic expression plasmids

Primer	Sequence (5'→3')	Size (bp)
IRAK1-F	ATGGCCGGGGGGCCAGGCCCG	2 136
IRAK1-R	TCAGCTCTGAAATTCATCACTC	
nsp11-F	GGGTCGAGCTCCCGCTCC	669
nsp11-R	TTCAAGTTGAAAATAGGCCG	
pCMV-Myc-IRAK1-F	GGAATTCATATGGCCGGGGG	2 152
pCMV-Myc-IRAK1-R	GGGTACCTCAGCTCTGAAATTC	
pCMV-HA-nsp11-F	GCGAATTCGGATGGGGTCGAG	692
pCMV-HA-nsp11-R	CTCCCCGC	
	GCGCGGCCGCTTCAAGTTGAA	
	AATAGGCCG	

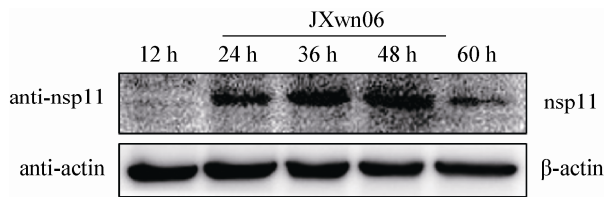


图 1 感染 PRRSV 后 nsp11 表达量的变化  
Figure 1 Analysis of the nsp11 expression at the indicated time points following PRRSV infection

## 2.2 与 nsp11 相互作用的宿主细胞蛋白的鉴定

**2.2.1 免疫沉淀及银染实验确定差异条带:** 用 PRRSV 感染 MARC-145 细胞, 同时设立空白细胞对照。于感染后 36 h 收取细胞样品, 用 nsp11 单克隆抗体进行免疫共沉淀, SDS-PAGE 胶进行银染的结果显示, 与对照组相比, 感染组共出现 3 条差异带(图 2)。

**2.2.2 质谱分析鉴定差异条带:** 分别切取 3 条差异条带进行脱色并冻干, 再加入胰蛋白酶缓冲液进行 FASP (Filter aided sample preparation) 酶解, 酶解产物经毛细管高效液相色谱脱盐及分离后进行质谱分析。结果显示, 共鉴定出 201 个可以与 PRRSV

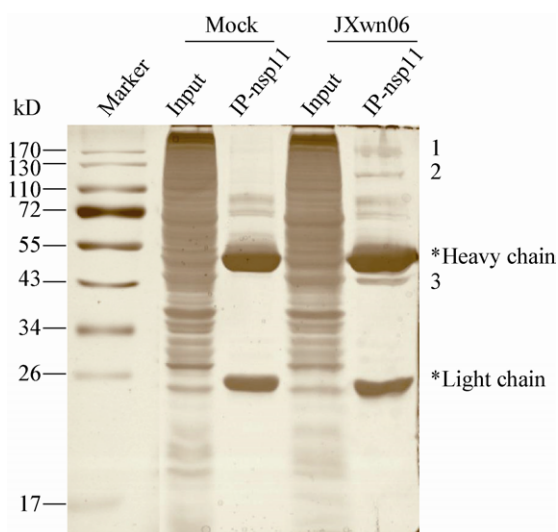


图 2 免疫沉淀及银染结果分析  
Figure 2 Analysis of the immunoprecipitation and silver staining

nsp11 进行相互作用的宿主细胞蛋白(表 2), 其中, 得分越高的蛋白可信度越高。

## 2.3 宿主细胞蛋白的生物信息学分析

**2.3.1 GO (Gene Ontology) 注释:** 对鉴定出的 201 个与 PRRSV nsp11 相互作用的宿主细胞蛋白进行 GO 注释。GO 总共有 3 个本体, 分别描述基因的分子功能、参与的生物过程和所处的细胞位置。分子功能分析结果显示: 与 PRRSV nsp11 互作的宿主细胞蛋白具有结合能力和酶活性(图 3A); 生物过程分析结果显示: 与 nsp11 互作的宿主细胞蛋白主要参与细胞的代谢过程, 蛋白质的转录、转录后修饰、翻译、运输过程、信号转导, RNA 的代谢过程等(图 3B); 细胞位置分析结果显示: 与 nsp11 互作的宿主细胞蛋白主要分布于细胞质、细胞膜、细胞核以及大分子复合体等部位(图 3C)。

**2.3.2 COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins) 注释:** 对鉴定出的 201 个与 PRRSV nsp11 相互作用的宿主细胞蛋白进行 COG 注释, 通过比对分析, 预测这些蛋白可能发挥的功能, 并对其功能进行分类统计。结果显示: 与 PRRSV nsp11 互作的宿主细胞蛋白主要功能与蛋白质的翻译和修饰、RNA 的加工和修饰以及信号转导等密切相关(图 4)。

**2.3.3 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 代谢通路注释:** KEGG 是一个整合了基因组、化学和系统功能信息的数据库。为了确定与 PRRSV nsp11 互作的宿主细胞蛋白所参与的主要生化过程和代谢通路, 本研究利用 KEGG 数据库对鉴定出的 201 个宿主细胞蛋白进行 Pathway 分类分析。结果显示: 与 nsp11 互作的宿主细胞蛋白主要参与核糖体代谢、碳代谢、剪切体代谢、氨基酸的生物合成以及病原的致病性等代谢通路(图 5)。

**2.3.4 蛋白互作分析:** 利用 STRING 在线分析软件, 对 201 个与 PRRSV nsp11 互作的宿主细胞蛋白进行分析并绘制互作图谱, 结果如图 6 所示。根据分析结果, 本研究从互作图谱中选择宿主细胞蛋白 IRAK1 对质谱结果进行验证。

表 2 与 nsp11 互作的宿主细胞蛋白  
Table 2 The proteins interacting with nsp11

Accession No.	Score	Coverage	Proteins	Unique peptides	Peptides	PSMs	AAs	MW (kD)	calc. pI	Name
F7EMW7	5 274.96	59.86	4	69	69	428	1 014	112.8	8.98	PARP1
H9FQM8	2 977.35	48.38	2	3	34	191	649	71.3	4.45	DBN1
H9Z082	2 030.99	50.19	6	49	49	114	1 044	119.6	9.41	MYO1C
G7NQi2	1 954.80	55.99	3	45	45	133	893	99.4	5.55	MVP
H9ERi1	1 405.82	49.74	5	1	50	93	951	106.8	6.15	RAI14
G7MV27	1 394.09	49.29	7	1	50	92	980	109.9	6.28	RAI14
F7B786	1 005.64	38.36	3	25	32	50	636	65.2	8.12	KRT1
H9ETH2	953.97	31.39	5	27	27	62	806	89.0	5.72	HNRNPU
H9YWZ9	935.51	45.27	9	46	46	69	1 078	124.9	9.20	MYO1B
H9Z5S3	799.14	40.32	1	6	32	52	940	104.1	6.90	AP2A2
H9FUT3	748.97	33.88	6	31	31	44	1 101	120.7	7.33	ACLY
H9FQM0	704.49	41.53	4	5	33	51	939	103.9	6.93	AP2A2
F6PL31	694.08	47.75	5	23	38	56	955	105.3	7.66	AP2A1
F6R5B1	644.19	36.19	9	34	34	44	1 003	113.5	8.73	MOV10
H9FQN1	641.38	43.01	4	21	34	55	937	104.5	5.38	AP2B1
G7N721	595.73	42.73	24	2	31	44	564	59.9	8.00	EGK_03678
I0FH43	588.20	34.33	7	32	32	37	1 066	116.7	5.99	VCL
I2CWY8	583.22	30.68	2	1	40	40	712	78.3	5.42	IRAK1
H9ERQ9	582.39	29.34	5	26	26	36	1 009	113.7	8.48	HLTF
F7GC25	557.38	35.66	2	32	33	51	858	95.3	6.83	EEF2
F7HAX4	514.06	42.82	6	27	27	31	808	91.0	5.77	MCM3
F6WRA1	463.16	26.59	2	24	24	34	1 117	124.4	5.76	SPECC1L
H9EMU1	459.83	28.62	4	19	19	36	856	95.7	6.92	RNPUL1
H9FQQ0	458.39	24.96	4	24	24	29	1 166	130.9	6.33	DHX9
H9F6W2	451.51	35.54	7	25	25	37	664	76.4	5.01	HNRNPUL2
F7APH2	411.66	42.81	8	16	16	27	306	32.8	8.16	HNRNPD
F7FHJ3	389.78	22.42	9	6	19	26	919	101.2	5.11	AP1B1
H9EPZ5	384.87	26.06	16	21	21	27	898	95.8	8.81	ILF3
F6TKP6	384.82	24.09	6	1	19	21	963	109.8	6.87	KIF5B
H9G179	380.20	27.52	3	18	18	25	814	92.3	4.96	EIF3B
G7N720	362.55	34.93	15	5	22	27	564	59.9	8.00	EGK_03677
F7AUV0	360.89	19.16	1	16	16	21	971	110.3	5.77	CSE1L
H9FV03	347.02	41.69	3	17	17	30	391	42.3	10.05	RBMX
G7N1U0	344.26	24.40	6	1	19	21	963	109.7	6.44	KIF5B
F7BMX8	342.28	33.51	2	30	30	35	934	101.3	7.06	MTHFD1
H9FUD1	336.58	15.67	2	2	22	28	1 385	158.3	6.23	LMO7
I2CXY9	324.37	23.48	8	8	16	19	724	83.2	5.03	HSP90AB1
F7H579	311.27	20.30	8	12	16	21	857	96.6	9.16	HSP90AB1

(待续)

(续表)

G7NS66	296.65	43.28	8	17	17	23	409	43.9	8.41	EGK_20668
H9EQB9	278.40	13.58	3	12	12	13	1 038	119.4	4.82	IPO7
F6U9A3	243.69	22.57	23	4	13	19	483	53.6	5.59	KRT8
F6RLH5	231.96	31.73	5	14	18	23	646	70.9	5.52	HSPA8
H9FNU8	230.67	30.66	4	12	12	14	424	46.9	7.27	PAICS
H9YXH3	224.24	15.52	8	20	20	23	1 675	191.5	5.69	CLTC
I2CXH1	221.05	26.59	5	16	16	22	707	76.1	9.44	SFPQ
F7DBX8	218.22	9.98	4	8	8	8	962	109.9	5.39	XPOT
H9FQK6	206.00	17.77	5	16	16	18	968	106.7	5.62	AARS
F6WWS6	201.34	13.78	2	10	10	12	798	87.2	5.35	USP10
F6R5W0	198.75	21.53	4	6	6	7	339	37.8	5.62	ERLIN2
H9Z8D1	191.80	22.49	5	3	8	10	449	49.3	6.30	HNRNPH2
F7A985	187.44	14.82	2	6	9	10	614	69.1	8.92	DDX5
H9FVV7	185.54	30.32	13	13	13	16	531	57.9	7.84	PKM2
F6UEF5	177.19	19.52	1	4	6	7	415	45.6	5.58	HNRNPF
G7ND21	174.71	18.16	4	18	18	21	1 140	126.9	5.26	DDB1
H9EYZ1	173.34	32.54	6	9	9	12	421	45.1	8.91	UQCRC2
H9FRU7	169.15	15.83	8	14	14	15	1 118	121.8	8.85	FAM120A
I2CYY2	166.79	10.41	4	9	9	10	961	106.8	6.52	LONP1
F6V6M4	159.38	24.10	2	7	7	7	361	37.8	5.45	EIF3F
G7NQG9	158.91	12.71	2	12	12	13	913	105.2	5.68	EIF3C
G7MUQ7	157.88	7.22	2	5	5	6	790	88.2	4.96	CDH6
F7DBK9	157.69	11.63	2	9	9	11	843	96.0	8.22	FTSJ3
F7GV16	157.54	22.00	14	6	6	11	350	38.2	8.18	LOC710682
H9FUX2	151.96	14.25	3	10	10	10	807	88.8	9.19	NOP2
G7N7G0	151.83	13.97	1	1	9	9	759	85.8	6.76	EGK_03838
G7N725	149.16	10.37	10	1	6	9	511	55.8	8.07	EGK_03682
H9FUZ0	148.08	11.94	6	9	9	10	997	109.7	5.40	ATP2A2
F6VFC8	146.24	16.78	14	6	6	10	441	47.8	8.97	LOC710682
F6XTF7	141.90	29.27	2	5	5	6	205	22.8	6.40	HSPB1
H9FAB5	139.49	20.10	11	6	6	6	393	44.7	5.47	EIF4A1
H9ENE8	139.24	9.10	2	6	6	6	835	93.3	5.06	USP5
H9F675	138.51	7.26	3	6	6	6	881	100.4	7.85	ERCC4
H9ENQ1	134.40	7.98	4	6	6	6	1 053	112.9	6.25	ANKRD28
H9FUU5	133.80	11.33	15	9	9	10	900	104.0	6.04	NEDD4
H9F0X7	132.62	9.33	1	10	10	10	1 082	129.6	6.98	EIF3A
F7BX98	132.36	20.82	1	11	11	13	802	92.2	8.18	CDC5L
F7HRC0	131.55	8.23	3	8	8	8	1 155	129.4	8.53	DHX30
F6QY64	130.74	12.23	3	10	10	10	981	112.3	5.22	USP15
F6U0V1	126.28	13.07	3	12	12	14	979	111.4	7.75	DHX36
I0FRR1	125.94	9.12	14	8	8	8	1 107	116.8	6.05	MAP4

(待续)

(续表)

F7DZD6	124.01	12.66	4	5	5	6	379	43.5	9.58	LYAR
H9F109	117.37	15.00	3	4	4	7	300	32.1	8.91	ZNF787
F7DC34	115.88	8.96	1	8	8	8	937	102.7	7.01	DDX42
F6ST49	114.62	20.37	8	6	6	7	427	47.8	9.52	DDB2
F7HPP2	111.11	26.50	2	6	7	8	351	39.5	5.27	TMOD2
G7N406	109.64	8.29	3	8	8	8	941	106.8	8.18	PRPF6
F7HE98	106.35	12.19	2	4	4	4	320	35.6	6.13	EIF3G
F7CA88	105.97	7.68	1	3	3	3	456	49.2	4.82	RNH1
H9FBQ3	105.51	28.88	3	5	5	5	277	31.4	6.95	PURA
G7NKJ4	104.56	3.34	2	2	2	2	1 049	113.9	4.94	EGK_09609
F6Q1Z2	104.47	4.28	1	2	5	5	1 052	121.8	8.09	SMARCA5
F6TF39	104.31	20.44	2	6	7	8	367	40.5	8.90	DRG1
H9F194	104.21	14.16	4	2	2	2	226	24.6	9.98	SERBP1
G7NJF1	103.16	8.46	5	7	7	8	958	109.0	7.20	EGK_09369
G7NRD4	103.11	7.93	7	5	8	8	996	116.8	8.65	EGK_20912
H9EVP0	101.23	8.84	4	3	3	4	475	54.3	8.73	DHCR7
F7HIW8	99.58	9.00	3	4	4	4	489	54.1	9.63	SPATS2L
G7NGX7	97.70	23.64	3	7	7	7	385	42.4	8.47	PRPSAP1
H9FYW3	97.70	8.45	7	4	7	8	698	78.9	5.22	SRPK2
F6VC72	97.44	12.79	1	11	11	11	821	92.8	5.41	MCM6
G7NPI5	96.88	23.30	4	5	5	7	309	35.3	5.86	EGK_12445
F6SFZ4	96.78	13.61	6	4	4	6	382	41.1	8.41	PGK1
H9FRE3	95.82	12.53	3	9	9	9	950	108.5	7.47	XRN2
H9F7A9	94.72	1.81	5	7	7	7	4 086	464.6	7.24	PRKDC
H9F922	94.37	4.92	2	5	5	5	914	104.7	7.59	RB1
F6VB85	92.78	12.07	5	9	9	9	820	95.6	9.55	DDX23
F7GEU6	92.48	13.24	2	9	9	10	793	88.8	5.22	SF3A1
F7D6M8	92.47	5.01	1	4	4	4	1 037	119.9	5.16	IPO8
F7GN57	91.88	9.66	3	3	4	4	414	46.6	6.87	IDH1
F6UDV1	90.03	10.23	3	4	4	4	430	47.4	9.01	GOT2
H9EYM1	88.41	25.28	3	3	3	4	178	18.8	5.02	PDCD2L
H9EP24	85.03	4.42	6	5	5	5	1 087	123.8	6.34	XPO7
I0FTY4	84.53	8.68	7	8	8	9	1 141	127.6	9.31	RFC1
F6ZSK0	84.30	10.22	3	6	7	7	890	97.2	9.88	RBM15B
H9FSW2	83.42	9.10	7	3	7	8	857	97.2	9.16	EIF2C1
F7GMY9	81.88	6.23	5	5	5	5	931	103.5	8.57	ADAR
G7NLX0	80.65	17.12	6	6	6	6	368	41.5	5.44	EGK_09938
F7H0C7	77.76	22.12	3	7	7	7	339	38.6	7.75	ANXA2
G7NLB1	76.94	21.84	2	5	5	8	348	38.8	4.91	ASNA1
H9FY79	76.16	6.13	10	0	6	7	913	102.2	5.83	SAFB
H9G2A7	74.56	5.68	2	1	6	6	933	103.9	5.87	SAFB2

(待续)

(续表)

F7CKR9	73.54	19.18	3	6	6	6	391	45.1	7.74	CSNK2A3
H9ZCT4	71.04	13.48	3	8	8	9	712	83.1	6.51	STAT1
H9F6A4	70.63	7.26	8	1	4	5	634	69.3	5.72	HSPA1A
G7N4I8	70.02	5.16	2	4	4	4	892	96.8	7.68	EGK_02290
F7DF58	68.19	1.54	2	1	1	1	781	87.2	8.00	NPHP3
G7N7D7	67.54	7.68	4	3	3	3	495	52.9	5.72	EGK_03812
H9G140	67.40	6.40	8	7	7	7	1 094	121.2	5.82	AP3B1
F6YEC2	67.11	3.19	3	3	3	3	1 221	138.8	5.45	EIF5B
F6ZH77	66.61	8.80	4	6	6	6	852	92.8	6.52	KDM1A
H9ZBR2	66.22	3.09	3	3	3	3	906	105.5	7.21	CWC22
H9ZC54	65.72	4.38	2	1	4	5	936	106.1	5.71	SAFB
H9F7S5	65.17	7.24	5	7	7	7	925	104.2	4.82	PPP4R1
G7N067	65.01	2.81	6	3	3	3	1 067	120.8	6.64	EGK_19304
F7ETD0	64.37	10.49	1	5	5	5	553	59.7	9.11	ATP5A1
I2CV68	63.59	7.96	5	7	7	7	1 081	118.6	5.00	IPO4
H9FWY9	63.22	8.00	5	8	8	9	1 012	113.9	7.05	IARS2
F7GH80	61.11	1.70	3	1	1	1	825	92.2	6.87	DDX20
H9FBN5	60.95	3.62	3	3	3	3	995	108.8	6.81	MIB1
H9F0N2	58.13	5.36	2	1	1	1	261	27.6	9.83	ZNF362
H9F138	56.72	6.83	8	2	5	6	761	86.0	9.28	EIF2C3
F6QE81	56.25	10.26	4	3	3	3	341	36.0	8.65	HNRNPA2B1
H9FUU1	55.76	2.63	3	1	1	1	457	51.9	7.97	NDUFS2
F6VI02	55.51	13.21	1	4	4	4	318	36.8	6.46	UBLCP1
F6X4D3	53.95	2.22	2	3	3	3	1 304	145.7	7.09	SF3B1
H9FN11	52.76	3.05	1	1	1	1	393	44.2	5.12	ATG4B
H9G2G0	52.42	2.67	7	2	2	2	748	86.0	10.40	BCLAF1
F7HGD2	52.39	3.59	1	1	1	1	390	43.0	5.26	ILF2
H9F9C2	51.69	3.37	3	1	1	1	415	49.0	5.15	RBM25
F7HBM4	50.58	7.18	8	3	3	3	390	43.3	8.06	PDHA1
H9Z9F1	49.80	4.81	8	6	6	6	1 019	115.5	7.02	OGDH
F6XE81	49.26	8.37	1	3	3	3	406	46.2	5.83	COPS4
F7H6Z9	48.98	6.50	1	7	7	8	1 230	136.3	5.78	CAND1
H9FH50	48.92	4.64	5	2	2	2	496	52.1	5.55	NFKB2
H9FIL0	48.38	3.26	5	1	2	2	582	67.5	5.80	JMY
F6VRQ3	48.18	4.78	4	3	3	3	983	103.9	6.98	UBAP2L
H9ZBD4	46.83	2.00	4	1	1	1	699	78.0	8.38	ZC3HAV1
H9FLN9	46.80	2.80	1	1	1	1	428	47.9	8.22	RFX1
H9G1Y1	46.19	1.31	3	1	1	1	1 066	122.5	5.24	UBE4A
H9F1W7	44.74	9.04	3	1	1	1	177	19.5	8.47	MBOAT7
D5MSD7	43.81	9.77	4	2	2	2	215	24.7	5.94	Mamu-B
F7HML3	43.74	8.24	3	3	3	3	437	50.1	6.74	EEF1G

(待续)

(续表)

G7N0C6	42.96	1.14	2	1	1	1	1 142	125.5	8.46	EGK_19382
H9ZB27	42.57	3.38	3	1	1	1	325	38.4	10.04	LUC7L
A4LAA1	42.42	2.17	4	1	1	1	554	62.1	8.03	EIF2AK2
F7H310	42.37	8.16	1	1	1	2	98	11.1	5.22	CSTA
F6ZWF5	41.77	7.52	2	1	1	1	133	14.4	10.17	FAU
G7MW18	40.75	4.56	3	4	4	5	856	95.6	9.09	DDX24
H9FTS8	39.31	11.11	7	3	3	3	459	50.4	5.39	HNRNPK
H9EPG0	38.09	2.44	5	1	1	1	532	59.6	9.16	HNRNPR
H9F226	38.09	5.90	1	2	2	2	288	32.8	8.27	BZW1
H9EZJ4	34.70	5.37	4	4	4	4	726	83.0	9.33	GNL2
H9FNM5	34.55	4.55	3	2	2	2	396	43.0	5.17	TFG
Q4G3W3	33.36	13.33	3	1	1	1	75	8.1	8.02	UQCRC1
G7NEX7	33.13	6.65	3	3	3	3	376	43.5	5.38	EGK_07498
H9F228	31.72	5.58	2	1	1	1	197	21.4	4.97	RGP1
H9ENN2	30.70	0.66	2	1	1	1	1 976	228.9	5.54	MYH10
H9FZB2	29.81	2.20	5	2	2	2	727	84.9	5.55	UBTF
H9YWJ9	28.79	1.09	4	1	1	1	916	103.8	5.55	USP4
H9F8G7	28.46	9.91	8	2	2	2	212	24.0	7.03	EEF2
H9FSS7	28.14	1.97	4	1	1	1	406	44.1	9.03	GTPBP5
F6YRM9	27.25	3.31	7	1	1	1	272	31.2	11.59	SRSF5
F7F549	27.01	1.77	1	1	1	1	396	45.5	8.84	VRK1
I2CTF1	26.79	4.93	6	2	2	3	568	63.6	8.40	SEPT9
H9YYW4	26.53	1.97	1	1	1	1	559	61.4	7.50	CHAF1B
H9F840	26.44	8.33	2	2	2	2	348	39.5	6.39	EIF3H
H9EWH2	26.30	2.43	2	1	1	1	329	36.7	8.25	SORBS3
H9ESD0	26.04	6.67	2	2	2	2	375	42.6	8.63	DEK
G8F1R1	25.56	8.98	2	2	2	2	245	27.8	9.32	EGK_21411
G7MJE1	25.37	8.46	3	2	2	2	402	47.2	6.18	TRIM59
F7HSJ3	25.28	3.59	1	1	1	1	418	46.9	6.93	AP3M1
F7HPF9	25.19	6.94	3	2	2	2	432	49.9	7.44	ORC4
F7H3Z6	24.78	2.89	1	1	1	1	380	42.5	8.84	FEN1
F7DIW5	24.65	1.95	1	1	1	1	462	51.4	7.39	NFIL3
F6Z1M1	24.33	3.19	3	1	1	1	345	38.7	6.68	ADK
B8Q9H3	24.29	2.54	1	1	1	1	354	39.8	6.15	Mamu-A
H9EYZ5	23.57	9.30	7	1	1	1	86	9.9	6.79	SRSF8
I0FWG2	23.00	0.60	4	1	1	1	1 993	220.2	8.48	TRIP12
F6YQX3	22.46	1.51	1	1	1	1	795	90.8	7.46	DHX15
G7NQG0	22.15	0.89	4	1	1	1	1 124	128.6	6.40	EGK_12629
H9F8L3	20.98	2.43	3	2	2	2	904	103.7	5.39	USP11
F7HIU3	20.55	3.41	4	3	3	3	792	91.2	6.47	WWP1

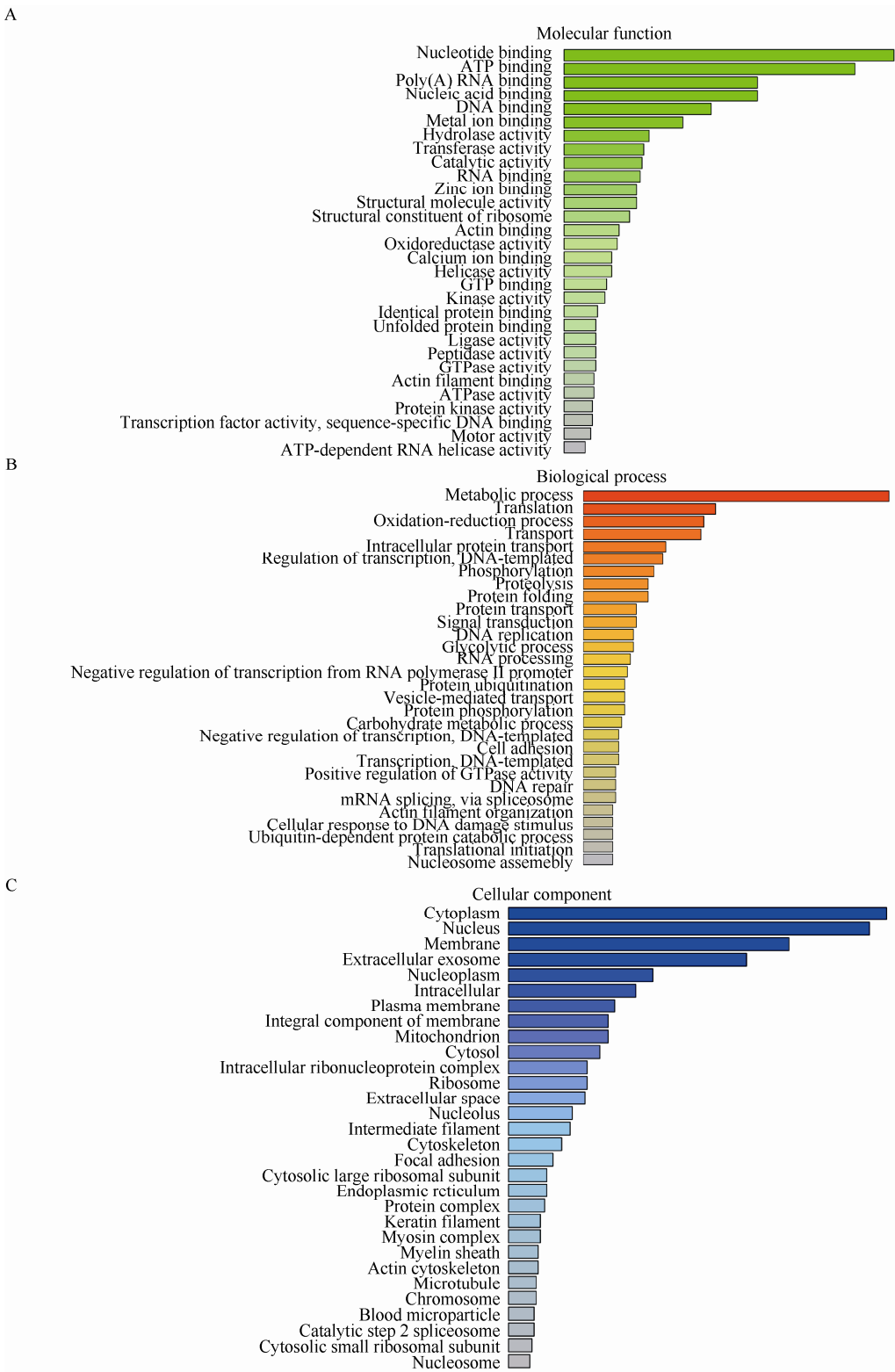


图 3 与 nsp11 互作的宿主细胞蛋白的 GO 功能分析

Figure 3 GO function analysis of the cellular proteins interacting with nsp11

注: A: 分子功能; B: 生物过程; C: 细胞组成.

Note: A: Molecular function; B: Biological process; C: Cellular component.

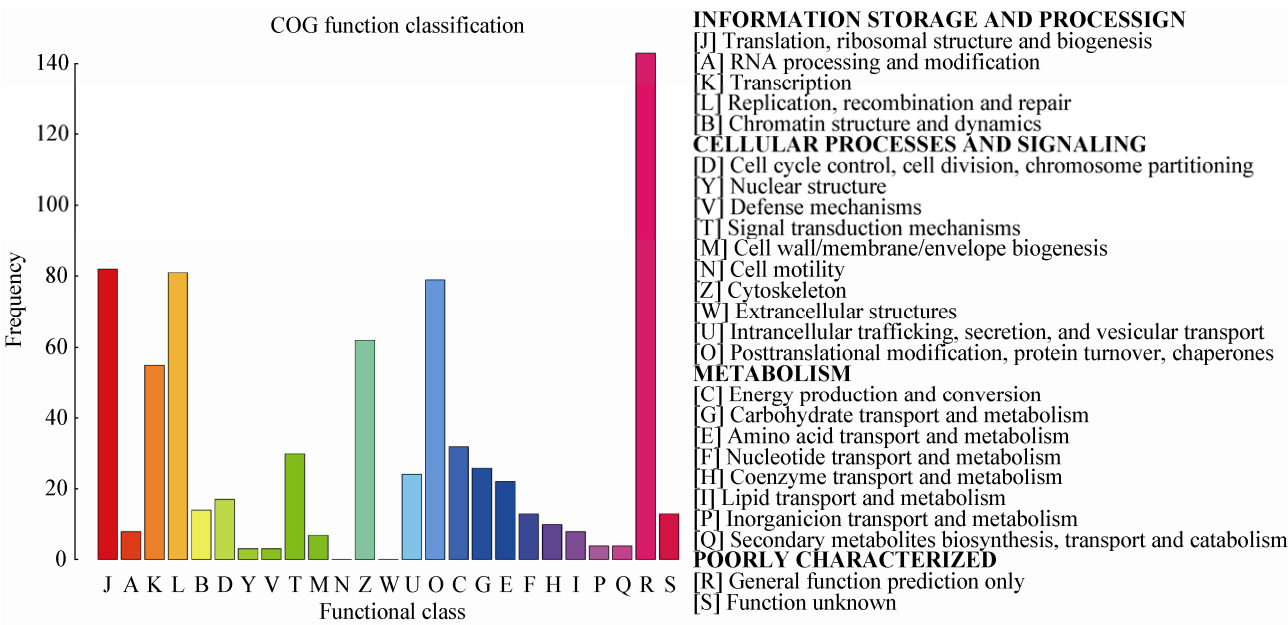


图 4 与 nsp11 互作的宿主细胞蛋白的 COG 功能分类

Figure 4 COG function classification of the cellular proteins interacting with nsp11

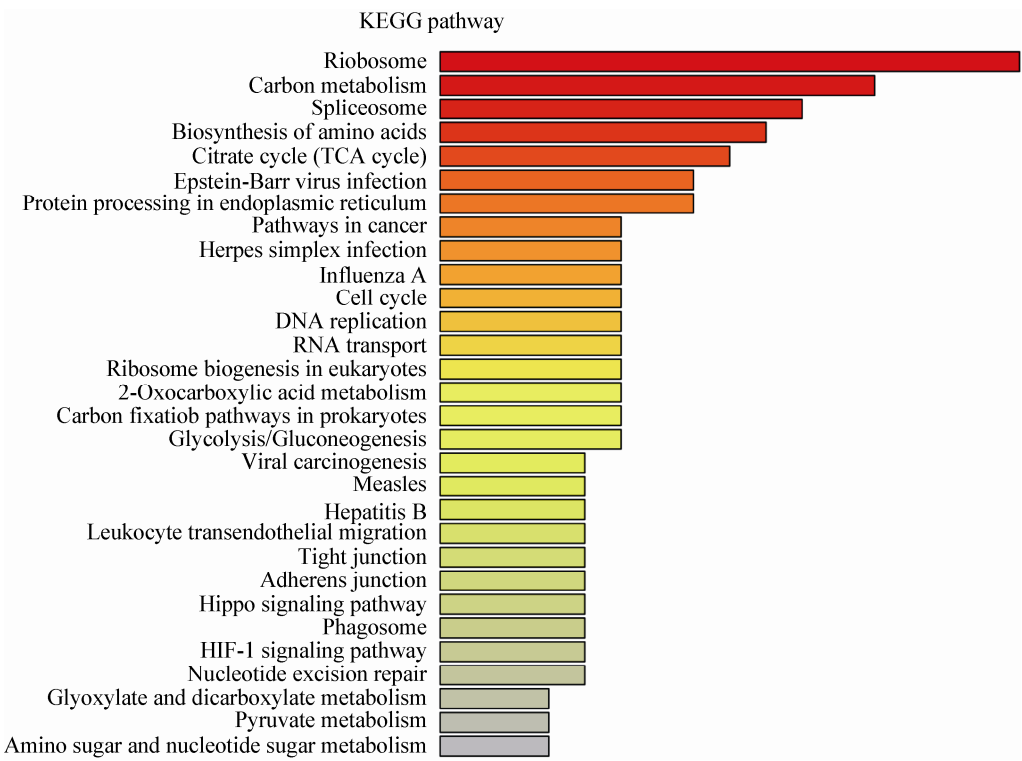
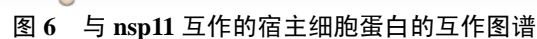


图 5 与 nsp11 互作的宿主细胞蛋白的 KEGG 代谢通路注释

Figure 5 KEGG pathway annotation of the cellular proteins interacting with nsp11



## 2.4 宿主细胞蛋白 IRAK1 与 PRRSV nsp11 相互作用的鉴定

主细胞蛋白 **IRAK1** 的相互作用：利用免疫共沉淀实验验证 PRRSV nsp11 与 IRAK1 之间的相互作用。实验结果显示，无论是在质粒共转染(图 7A)还是病毒感染的情况下(图 7B)，PRRSV nsp11 都可以与宿主细胞蛋白 **IRAK1** 进行相互作用。

光技术,通过激光共聚焦显微镜观察 nsp11 与 IRAK1 在细胞中的共定位情况。将 pCMV-HA-nsp11 和 pCMV-Myc-IRAK1 质粒分别单独转染和共转染于 MARC-145 细胞中,24 h 后收取细胞样品进行免疫荧光染色和使用激光共聚焦显微镜观察。实验结果显示,单独转染 pCMV-HA-nsp11 质粒时,nsp11 分布在细胞核和细胞质中(图 8A);单独转染 pCMV-Myc-IRAK1 质粒时,IRAK1 定位于细胞质中(图 8B);而共转染 pCMV-HA-nsp11 和 pCMV-Myc-IRAK1 质粒时,nsp11 和 IRAK1 则共定位于细胞质中(图 8C)。

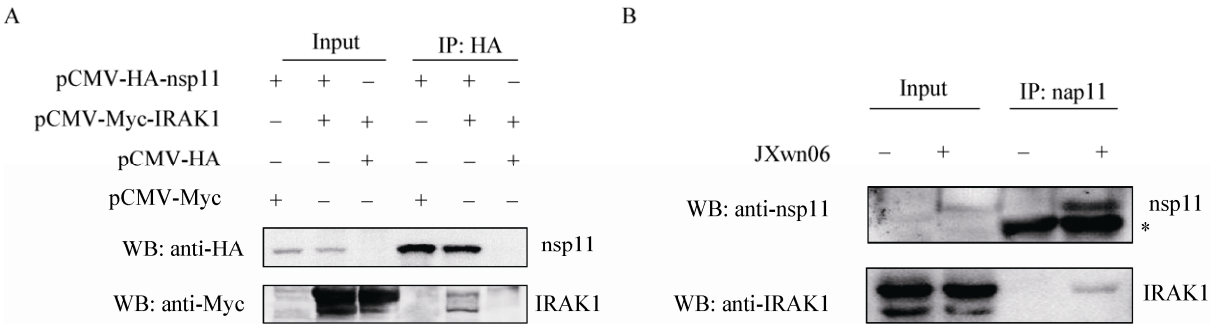


图 7 nsp11 与 IRAK1 之间相互作用的验证

Figure 7 Confirmation of the interaction between nsp11 and IRAK1

注：A：在 293FT 细胞中共转染 pCMV-HA-nsp11 和 pCMV-Myc-IRAK1 质粒，验证 nsp11 和 IRAK1 之间的相互作用；B：将 JXwn06 感染于 MARC-145 细胞，验证 nsp11 和 IRAK1 之间的相互作用。

Note: A: 293FT cells were co-transfected with pCMV-HA-nsp11 and pCMV-Myc-IRAK1, the interaction between nsp11 and IRAK1 were validated; B: MARC-145 cells were infected with JXwn06, the interaction between nsp11 and IRAK1 were validated.

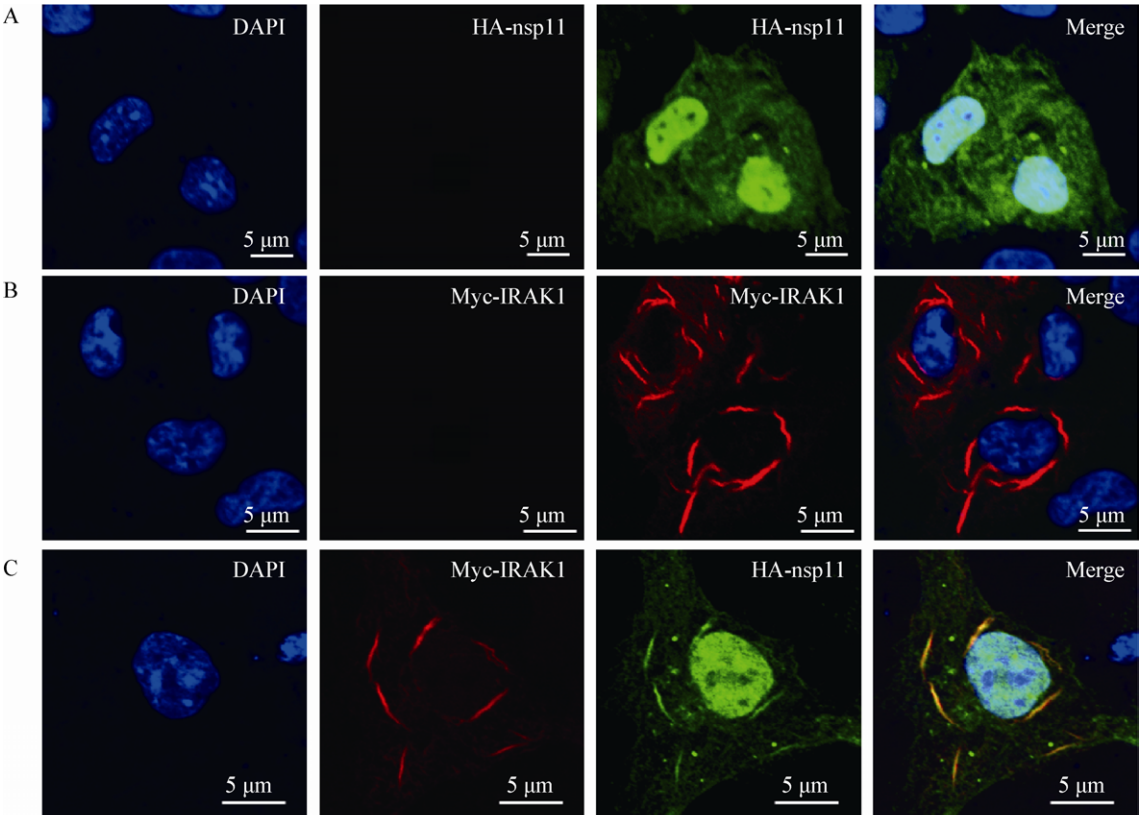


图 8 nsp11 与 IRAK1 在细胞中的共定位分析

Figure 8 Co-localization of nsp11 and IRAK1 in MARC-145 cells

注：A：nsp11 在 MARC-145 细胞中的定位情况；B：IRAK1 在 MARC-145 细胞中的定位情况；C：nsp11 和 IRAK1 在 MARC-145 细胞中的共定位情况。

Note: A: Localization of nsp11 in MARC-145 cells; B: Localization of IRAK1 in MARC-145 cells; C: Co-localization of nsp11 and IRAK1 in MARC-145 cells.

### 3 结论与讨论

病毒蛋白可以通过利用与宿主细胞蛋白之间的相互作用而为病毒的复制创造有利的环境,从而引起宿主的严重疾病<sup>[23]</sup>。研究病毒蛋白与宿主细胞蛋白之间的相互作用可以为解析病毒蛋白的功能以及病毒复制的分子机制奠定基础<sup>[24]</sup>,近年来病毒非结构蛋白与宿主细胞蛋白之间的相互作用以及互作对病毒的复制和致病性的调控成为研究热点。Beura 等研究发现 PRRSV nsp1 $\beta$  可以与宿主细胞蛋白 PCBP1 和 PCBP2 相互作用,PCBP1 和 PCBP2 不仅共定位于病毒的复制复合体上,而且还可以与病毒 5'UTR 结合来调控病毒 RNA 的合成<sup>[25]</sup>; Dong 等研究证明 PRRSV nsp9 通过与宿主细胞蛋白 pRb 的相互作用使 pRb 被泛素蛋白酶体降解而有利于病毒的复制, nsp9 与 pRb 的互作为病毒的复制提供了有利环境<sup>[26]</sup>; Zhao 等研究表明 PRRSV nsp9 通过与宿主细胞蛋白 DDX5 的相互作用而改变其亚细胞定位, DDX5 从细胞核转移到细胞质中与 nsp9 进行共定位,作为一种辅助因子正调控病毒的复制<sup>[27]</sup>。以上研究结果表明,PRRSV 的非结构蛋白与宿主细胞蛋白之间的相互作用在调控病毒复制和致病性中扮演着重要角色,而与 PRRSV nsp11 相互作用的宿主细胞蛋白及互作对 PRRSV 复制调控和致病性的影响鲜有报道。PRRSV nsp11 具有核酸内切酶的活性和去泛素化酶活性<sup>[14,28]</sup>,对 PRRSV 的复制起关键作用;此外, nsp11 作为干扰素的拮抗剂可以抑制 INF- $\beta$ 、IRF3 和 NF- $\kappa$ B 的激活<sup>[14-15]</sup>,为病毒的复制提供有利的环境。PRRSV nsp11 在发挥以上功能时需要大量宿主细胞蛋白协助,为了进一步明确 nsp11 的生物学功能,本研究从 nsp11 与宿主细胞蛋白的相互作用入手,筛选和鉴定与 nsp11 相互作用的宿主细胞蛋白并进行生物信息学分析,对于揭示 nsp11 在病毒复制过程中可能发挥的功能有重要的参考价值。

利用单克隆抗体在病毒感染的宿主细胞中进行免疫沉淀筛选与病毒蛋白相互作用的宿主细胞蛋白,能够更加全面和真实地反映两者的相互作

用。本研究利用自行研制的 nsp11 单克隆抗体进行免疫沉淀结合串联质谱鉴定,筛选得到了 201 个与 nsp11 相互作用的宿主细胞蛋白,并对这些蛋白进行了全面的生物信息学分析。分析结果显示,与 nsp11 互作的宿主细胞蛋白与蛋白质的代谢过程密切相关,由此可以推测,病毒利用了宿主细胞的翻译系统来完成自身蛋白质的合成,进一步证明了 nsp11 在病毒的复制过程中发挥重要作用;与 nsp11 互作的宿主细胞蛋白与细胞信号通路的转导有关,为研究 PRRSV 对宿主的免疫应答的影响提供了新的靶标蛋白和通路;与 nsp11 互作的宿主细胞蛋白与病原的致病性相关,为研究 PRRSV 的致病机制提供了参考和新的思路。

为了验证生物信息学分析的可信性,我们利用免疫共沉淀及激光共聚焦实验对筛选出的宿主细胞蛋白 IRAK1 与 PRRSV nsp11 的相互作用进行检测,证实 PRRSV nsp11 可以与内源表达的 IRAK1 相互作用,且两者共定位于细胞质中。IRAK1 是 IRAKs 家族成员之一,具有多种生物学功能,是一种关键的固有免疫信号调节因子<sup>[29]</sup>,作为细胞溶质激酶、核激酶及接头蛋白,参与调控 TLR/IL-1R 两个受体家族的信号级联反应,调节 TNF- $\alpha$ 、I 型干扰素及 AP-1 等炎症因子的表达<sup>[30-32]</sup>。IRAK1 在 TLR 信号通路中发挥正调控的作用,可通过直接调控 IRF7 的磷酸化而参与调控 TLR7/9 信号通路介导 IFN- $\alpha$  的产生<sup>[33]</sup>;也有研究表明,IRAK1 参与调控 TLR7 信号通路介导 IRF5/7 的激活<sup>[34]</sup>。由于 nsp11 具有拮抗宿主先天性免疫应答反应的作用,而 IRAK1 又是先天性免疫信号通路中关键的调节因子<sup>[29]</sup>,根据生物信息学分析结果,推测 nsp11 与 IRAK1 之间的相互作用可能通过影响 IRAK1 对其下游信号分子 IRF5/7 和 I 型干扰素等的调控来影响宿主的先天性免疫反应,从而有利于病毒的复制。

### 参考文献

- [1] Albina E. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview[J]. *Veterinary Microbiology*, 1997, 55(1/4): 309-316
- [2] Keffaber KK. Reproductive failure of unknown etiology[J].

- American Association of Swine Practitioners Newsletter, 1989, 1(2): 1-9
- [3] Wensvoort G, Terpstra C, Pol JMA, et al. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus[J]. *Veterinary Quarterly*, 1991, 13(3): 121-130
- [4] Kuwahara H, Nunoya T, Tajima M, et al. An outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome in Japan[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1994, 56(5): 901-909
- [5] Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States[J]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2005, 227(3): 385-392
- [6] Chang CC, Chung WB, Lin MW, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Taiwan I. Viral isolation[J]. *Journal of the Chinese Society Veterinary Science*, 1993, 19(4): 268-276
- [7] Guo BQ, Chen ZS, Liu WX, et al. Isolation and identification of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from aborted fetuses suspected of PRRS[J]. *Chinese Journal of Animal and Poultry Infectious Diseases*, 1996(2): 1-5 (in Chinese)  
郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究[J]. *中国畜禽传染病*, 1996(2): 1-5
- [8] Tian KG, Yu XL, Zhao TZ, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J]. *PLoS One*, 2007, 2(6): e526
- [9] Li Y, Zhou L, Zhang JL, et al. Nsp9 and Nsp10 Contribute to the fatal virulence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China[J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(7): e1004216
- [10] Du JG, Ge XN, Liu Y, et al. Targeting swine leukocyte antigen class I molecules for proteasomal degradation by the nsp1 $\alpha$  replicase protein of the Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain JXwn06[J]. *Journal of Virology*, 2016, 90(2): 682-693
- [11] Shi XB, Zhang XZ, Chang YZ, et al. Nonstructural protein 11 (nsp11) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) promotes PRRSV infection in MARC-145 cells[J]. *BMC Veterinary Research*, 2016, 12: 90
- [12] Rascón-Castelo E, Burgara-Estrella A, Mateu E, et al. Immunological features of the non-structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Viruses*, 2015, 7(3): 873-886
- [13] Nedialkova DD, Ulferts R, van den Born E, et al. Biochemical characterization of arterivirus nonstructural protein 11 reveals the nidovirus-wide conservation of a replicative endoribonuclease[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(11): 5671-5682
- [14] Wang D, Fan JX, Fang LR, et al. The nonstructural protein 11 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits NF- $\kappa$ B signaling by means of its deubiquitinating activity[J]. *Molecular Immunology*, 2015, 68(2): 357-366
- [15] Sun Y, Ke H, Han M, et al. Nonstructural protein 11 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus suppresses both MAVS and RIG-I expression as one of the mechanisms to antagonize type I interferon production[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0168314
- [16] Wang C, Shi XB, Zhang XZ, et al. The endoribonuclease activity essential for the nonstructural protein 11 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to inhibit NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 $\beta$  induction[J]. *DNA and Cell Biology*, 2015, 34(12): 728-735
- [17] Zhang X, Shi HY, Chen JF, et al. Identification of the interaction between vimentin and nucleocapsid protein of transmissible gastroenteritis virus[J]. *Virus Research*, 2015, 200: 56-63
- [18] Brito AF, Pinney JW. Protein-Protein interactions in virus-host systems[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1557
- [19] Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research[J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(18): 3674-3676
- [20] Kanehisa M, Araki M, Goto S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(Database issue): D480-D484
- [21] Wang L, Zhou L, Zhang H, et al. Interactome profile of the host cellular proteins and the nonstructural protein 2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99176
- [22] Jin H, Zhou L, Ge XN, et al. Cellular DEAD-box RNA helicase 18 (DDX18) promotes the PRRSV replication via interaction with virus nsp2 and nsp10[J]. *Virus Research*, 2017, 238: 204-212
- [23] Khadka S, Vangeloff AD, Zhang CY, et al. A physical interaction network of dengue virus and human proteins[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011, 10(12): M111.012187
- [24] Toh QC, Tan TL, Teo WQ, et al. Identification of cellular membrane proteins interacting with hepatitis B surface antigen using yeast split-ubiquitin system[J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2005, 2(3): 114-117
- [25] Beura LK, Dinh PX, Osorio FA, et al. Cellular poly(C) binding proteins 1 and 2 interact with porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1 $\beta$  and support viral replication[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(24): 12939-12949
- [26] Dong JG, Zhang N, Ge XN, et al. The interaction of nonstructural protein 9 with retinoblastoma protein benefits the replication of genotype 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus *in vitro*[J]. *Virology*, 2014, 464-465: 432-440
- [27] Zhao SC, Ge XN, Wang XL, et al. The DEAD-box RNA helicase 5 positively regulates the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by interacting with viral Nsp9 *in vitro*[J]. *Virus Research*, 2015, 195: 217-224
- [28] Zhang MF, Li XR, Deng ZQ, et al. Structural biology of the arterivirus nsp11 endoribonucleases[J]. *Journal of Virology*, 2016, 91(1): e01309-16
- [29] Flannery S, Bowie AG. The interleukin-1 receptor-associated kinases: critical regulators of innate immune signalling[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2010, 80(12): 1981-1991
- [30] Cai JJ, Zhou J. The research advance of IRAK1 in immune regulation[J]. *International Journal of Immunology*, 2011, 34(6): 327-331 (in Chinese)  
蔡娇娇, 周俊. 白介素-1 受体相关激酶 1 在免疫调控中的研究进展[J]. *国际免疫学杂志*, 2011, 34(6): 327-331
- [31] Ho BC, Yu IS, Lu LF, et al. Inhibition of miR-146a prevents enterovirus-induced death by restoring the production of type I interferon[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3344
- [32] Rhyasen GW, Bolanos L, Fang J, et al. Targeting IRAK1 as a therapeutic approach for myelodysplastic syndrome[J]. *Cancer Cell*, 2013, 24(1): 90-104
- [33] Uematsu S, Sato S, Yamamoto M, et al. Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7-and TLR9-mediated interferon- $\alpha$  induction[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2005, 201(6): 915-923
- [34] Schoenemeyer A, Barnes BJ, Mancl ME, et al. The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(17): 17005-17012