

# 轮状病毒 NSP5 克隆、鉴定、表达及其条件优化

林家锋,陶晓莉,陆恒章,于美玲,李婷婷,李藤菲,程美慧,李永刚

**摘要:**目的 为制备 NSP5 多克隆抗体及进一步研究 NSP5 的功能和在轮状病毒复制中的作用奠定基础。方法 利用分子克隆的技术构建出原核表达蛋白质粒 NSP5-pGEX-6P-1 和真核表达质粒 NSP5-pFLAG-CMV-3, 其中 NSP5-pFLAG-CMV-3 转染细胞后通过 Western Blot 和间接免疫荧光法观测 NSP5 在 293T 细胞里的表达和定位; NSP5-pGEX-6P-1 经转化 *E.coli* BL21(DE3) 后从 IPTG 浓度、温度及历经时间 3 个方面摸索出最优化的诱导蛋白表达条件, 并经 GST 琼脂糖树脂纯化蛋白且用 SDS-PAGE 和 Western Blot 进行鉴定。**结果** 构建了真核表达载体 NSP5-pFLAG-CMV-3 和原核表达载体 NSP5-pGEX-6P-1。经 NSP5-pFLAG-CMV-3 转染后的 293T 细胞通过 Western Blot 验证 NSP5 蛋白在细胞中成功表达, 间接免疫荧光观察到重组蛋白在细胞质中富集。37 °C、8 h、0.4 mmol/L IPTG 诱导是 NSP5-pGEX-6P-1 蛋白表达的最适条件, 且以包涵体形式汇聚在沉淀中进行表达。SDS-PAGE 和 Western Blot 表明重组蛋白纯化成功。**结论** 成功构建 NSP5 重组表达系统, 成功优化了 NSP5 蛋白诱导表达的条件并纯化蛋白。

**关键词:**轮状病毒; NSP5; 基因重组; 蛋白表达; 蛋白纯化

中图分类号:R373.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2021)08-0703-06

## Cloning, identification, expression and optimization of induction of rotavirus NSP5

LIN Jia-feng, TAO Xiao-li, LU Heng-zhang, YU Mei-ling, LI Ting-ting,  
LI Teng-fei, CHENG Mei-hui, LI Yong-gang

(Department of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences,  
Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

**Abstract:** We aimed to lay a foundation for the development of NSP5 polyclonal antibodies and follow-up studies on the function of NSP5 and its role in rotavirus replication. Molecular recombination technology was used to construct the recombinant plasmids NSP5-pGEX-6P-1 and NSP5-pFLAG-CMV-3. Subsequently, NSP5-pFLAG-CMV-3 was transfected into cells. Western blotting was used to detect NSP5 expression, and cellular localization tests were rapidly performed with IFA. NSP5-pGEX-6P-1 was transformed into *E. coli* BL21 (DE3), and the prokaryotic expression conditions were optimized in terms of IPTG concentration, temperature and induction time. We purified the protein with GST Sefinose resin and identified it by SDS-PAGE and western blotting. Finally, NSP5-pFLAG-CMV-3 and NSP5-pGEX-6P-1 were constructed. NSP5 was found to be highly expressed in cells, and fluorescence microscopy indicated that it was mainly concentrated in the cytoplasm. After several optimization tests, the optimal induction conditions for prokaryotic expression of NSP5-pGEX-6P-1 were determined to be 37 °C, 8 h and 0.4 mmol/L IPTG after transformation of *E. coli* BL21 (DE3). In addition, the protein was found primarily in inclusion bodies in the pellet. SDS-PAGE and western blotting showed that the recombinant protein was successfully purified. In short, an NSP5 recombinant system was successfully developed, and the optimized conditions for inducing expression of NSP5 enabled successful protein purification.

**Keywords:** Rotavirus; NSP5; gene recombination; protein expression; protein purification

辽宁省教育厅青年育苗项目(No.JYTQN201925)

通讯作者:李永刚,Email: lygjo@hotmail.com;

ORCID: 0000-0002-3600-2994

作者单位:锦州医科大学基础医学院病原生物学教研室, 锦州  
121000

Supported by the Education Youth Nursery Project of Liaoning Provincial Department (No.JYTQN201925)

Corresponding author: Li Yong-gang, Email: lygjo@hotmail.com

轮状病毒(Rotavirus, RV)是能够使人类和动物引起一系列消化系统症状的常见病毒,可侵及小肠黏膜并且附着定居,给宿主细胞造成极大的危害<sup>[1]</sup>。与其他 RNA 病毒相比,它参与编码 6 种结构蛋白(VP1、VP2、VP3、VP4、VP6、VP7)及 6 种非结构蛋白(NSP1、NSP2、NSP3、NSP4、NSP5、NSP6),对病毒的增殖及致病有着重要的生物学意义<sup>[2-4]</sup>。RV 大多通过粪-口途径传播,秋冬季节活跃,在一般环境中能稳定生存。它在世界范围内广泛存在,分型众多,A~C 组能够导致人类和动物腹泻,D~G 组只能导致动物腹泻,给当地家畜业及卫生健康构成极大的威胁<sup>[5-6]</sup>。一经感染,便可诱发蛋花汤样便、眩晕、发热等具体表现,严重者会因机体内环境失衡而脱水、休克死亡<sup>[7]</sup>。然而,目前尚无治疗该病毒公认有效的药品或疫苗,此外该病毒与宿主间的互作机制和致病机理还有待进一步研究。

作为一种重要的非结构蛋白,NSP5 具有高度磷酸化的功能,能在细胞质内表达且稳定调控病毒的复制和感染周期。研究表明,具有多个骨架蛋白修饰位点的 NSP5 可与 NSP2、VP2 以及 VP6 蛋白共同构成病毒质体,而病毒质体又是病毒复制的主要场所<sup>[8-10]</sup>。一些学者通过小干扰 RNA7(MicroRNA-7)靶向下调 NSP5 的表达,从而影响病毒质体的形成并抑制 RV 复制<sup>[11]</sup>。由此可见,NSP5 在病毒的增殖表达及生物学活性中发挥着重要的作用,但具体机制还不清楚,本研究利用分子克隆的方法构建 A 组 RV-NSP5 重组表达载体来检测其在细胞内的表达,并对原核表达的条件进行优化分析,确定融合蛋白的富集位置,从而进一步探究分离株 RV NSP5 在病毒增殖中所承担的作用,同时为后续多抗及相关制剂的制备提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

1.1.1 病毒、细胞与质粒 本实验所用的 A 组 RV 病毒株分离自辽宁省锦州市妇婴医院一患儿粪便样品,293T 细胞购于北京协和医学院细胞中心,pGEX-6P-1 原核表达载体和 pFLAG-CMV-3 真核表达载体由锦州医科大学病原生物学实验室保存。

1.1.2 试剂 KOD-PLus-Neo PCR 扩增试剂盒购买于日本 TOYOBO 公司;限制性内切酶 EcoR I 酶、Xho I 酶、Xba I 酶、DNA 连接酶和反转录试剂盒均购买于大连 TaKaRa 公司;TRIzol Reagent LS 购买于 Ambion 公司;DNA 凝胶回收试剂盒、质粒 DNA 中提试剂盒都购买于美国 Axyprep 公司;普通 DNA 产物纯化试剂盒购买于北京天根生化科技有限公司;DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)感受态细胞、氨苄西林钠(Ampicillin, Amp)、异丙基硫代半乳糖苷(Iso-propyl  $\beta$ -D-Thiogalactoside, IPTG)、酵母提取物、胰蛋白胨都购买于北京索来宝科技有限公司;DMEM 培养基、胎牛血清都购买于 Gibco 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购买于碧云天生物技术公司;GST 琼脂糖纯化树脂购买于上海生工公司;抗 FLAG 单克隆抗体购买于 Sigma 公司;Mouse Anti- $\beta$ -actin mAb 和 Mouse Anti-GST mAb 购买于北京中杉金桥生物技术有限公司;Alexa Flour 594 goat anti-mouse IgG (H+L) 和 HRP-goat anti-mouse IgG (H+L) 都购买于美国 Invitrogen 公司等。

### 1.2 NSP5 原核及真核表达载体的构建

1.2.1 引物设计与合成 根据分离所得的病毒株进行引物设计并经 BLAST 检测特异性、测序检测准确性。详见表 1。

表 1 轮状病毒 NSP5 原核及真核表达引物

Tab.1 Rotavirus NSP5 prokaryotic and eukaryotic expression primers

构建质粒名称	序列	限制性内切酶	产物长度/bp
NSP5-pGEX-6P-1	F: TAAGGAATT <u>CATGTCTCTCAGCATTGACGTAAC</u> R: ATTACT <u>CGAGTTACAAATCTTCGATCAATTGCA</u>	Eco R I Xho I	605
NSP5-pFLAG-CMV-3	F: TAAGGAATT <u>CATGTCTCTCAGCATTGACGTAAC</u> R: CTCG <u>TCTAGATTACAAATCTTCGATCAATTGC</u>	Eco R I Xba I	605

注:下划线部分为酶切位点。

1.2.2 提取 RV RNA 及 PCR 扩增 NSP5 从 RV 病毒分离株提取 RNA,经过反转录、PCR 反应获得特异 NSP5 基因。反应体系及成分为:KOD-PLus-

Neo 酶 1  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L, dNTP 5  $\mu$ L, MgSO<sub>4</sub> 3  $\mu$ L, 10×PCR Buffer 5  $\mu$ L, 上下游引物各 1  $\mu$ L, 最后用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 50  $\mu$ L; 条件如下:94 °C 持续 2

min; 98 ℃持续 10 s, 58 ℃持续 30 s, 68 ℃持续 30 s, 共 35 个循环; 最后 68 ℃持续 7 min。电泳后, 将 NSP5 目的条带切胶并且纯化回收, 测序验证。

**1.2.3 NSP5-pGEX-6P-1 和 NSP5-pFLAG-CMV-3 的构建和鉴定** 对纯化的 NSP5 片段和空载体双酶切, 酶切反应体系分别为 pGEX-6P-1 或 NSP5 2.5 μg, EcoR I 1 μL, Xho I 1 μL, 10×H Buffer 5 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足至 50 μL; pFLAG-CMV-3 或 NSP5 2.5 μg, EcoR I 1 μL, Xba I 1 μL, 10×M Buffer 5 μL, 0.1% BSA 5 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足至 50 μL, 条件为 37 ℃水浴 3 h。DNA 液体纯化再回收, 经电泳验证和理论大小相符时, 把载体片段以及目的片段按 1:5 比例、总体积 10 μL 进行连接, 连接酶 10 μL, 16 ℃反应 1 h, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 第 2 d 选细菌培养板上生长状况良好的单克隆菌落, 进行菌落 PCR 的初步验证。验证阳性者, 即可中提质粒, 双酶切验证。所得质粒送至南京金斯瑞生物科技有限公司测序验证。

### 1.3 NSP5-pFLAG-CMV-3 真核细胞转染及相关检测

**1.3.1 293T 细胞培养及转染** 293T 细胞按照每孔  $6 \times 10^5$  的数量级加到 6 孔板中, 培养过夜。等到 60%~70% 的时候, 每个孔 240 μL Opti-MEM 稀释 10 μL PEI, 轻柔混合切勿振荡, 室温孵育 5 min; 然后 240 μL Opti-MEM 稀释 4 μg NSP5-pFLAG-CMV-3 重组质粒, 用同样的方法稀释 pFLAG-CMV-3 空载体。把上述稀释液分别缓慢混合, 室温孵育 20 min。最后, 加入对应孔培养细胞 48 h, 用于 Western Blot 和间接免疫荧光检测。

**1.3.2 Western blot 检测** NSP5-pFLAG-CMV-3 转染后, 吸弃上清液体, 每个孔加入 250 μL 的 NP-40, 变性、离心、-20 ℃保存。蛋白样品经过 10% SDS-PAGE 分离, 15V 半干转 12 min, PVDF 膜右上角裁角标记, 5% 脱脂奶粉封闭 2.5 h。然后, 用封闭液 1:2 000 稀释鼠抗 β-actin 抗体、1:5 000 的比例稀释鼠抗 FLAG 抗体, 浸没 PVDF 膜 4 ℃过夜。1×PBST 洗膜 10 min × 3 次; 二抗 HRP-goat anti-mouse IgG (H+L) 经 1:3 000 稀释后将膜均匀孵育, 室温 1 h, 洗膜 10 min × 3 次。ECL 显影拍照, 检测 NSP5-pFLAG-CMV-3 蛋白在细胞水平上的表达。

**1.3.3 间接免疫荧光检测** 取出细胞培养板置于室温下, 弃掉原有培养液, 4% 多聚甲醛静置 1 h, 500 μL PBS 洗涤 3 次, 加 200 μL 0.1% Triton X-100 静置 15 min, 500 μL PBS 洗涤 3 次。1% BSA

静置 1 h, PBS 洗后, 加 1:200 比例稀释的鼠抗 FLAG, 37 ℃孵箱中静置 1 h。吸掉一抗, 500 μL PBS 洗涤 3 次, 避光环境下加入 1:500 比例稀释的羊抗鼠荧光二抗, 37 ℃湿盒避光 1 h, 吸掉二抗, PBS 洗涤后, 运用荧光显微镜采图。

### 1.4 NSP5-pGEX-6P-1 原核表达和条件优化

**1.4.1 NSP5-pGEX-6P-1 在大肠杆菌中的原核表达** NSP5-pGEX-6P-1 转化到 *E.coli* BL21(DE3) 中, 置在细菌培养箱生长过夜。第二天把重组菌的单菌落接种至 150 mL 新鲜的 LB 培养液 (1:1 000 的比例加了 Amp), 在恒温摇床培养, 直至重组菌菌体 OD 值达到 0.6~0.8 时, 设置不同变量对最适蛋白诱导表达条件进行摸索: IPTG 浓度 (0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L)、诱导温度 (28 ℃ 和 37 ℃) 以及诱导时间 (2、4、6、8、10、12 h)。

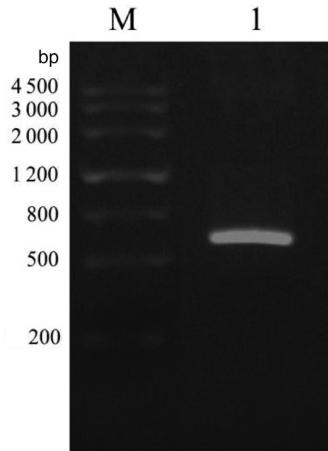
### 1.4.2 NSP5-pGEX-6P-1 可溶性表达、纯化及鉴定

取出保存的最佳诱导条件下菌体蛋白, 冰浴超声破碎: 每次工作 5 s, 间歇 10 s, 总共超声 99 次。然后, 离心, 保存上清, 冰浴条件下用 400 μL PBS 将沉淀吹打均匀。各吸 50 μL 上清及沉淀, 变性、离心后制成样品, 进行后续 SDS-PAGE 分析。经大量诱导表达后, 沉淀蛋白用含盐酸胍的变性缓冲液充分溶解, 4 ℃摇晃过夜。次日, 不断用不含盐酸胍的复性缓冲液超滤置换, 直至液体清透。根据 GST 琼脂糖纯化树脂说明书, 控制流速上柱洗脱, 并测定纯化所得目的蛋白的浓度。随后, 将纯化的重组蛋白转移至 PVDF 膜, Mouse Anti-GST mAb 为一抗、HRP-goat anti-mouse IgG (H+L) 为二抗, 分别以 1:2 000 和 1:3 000 稀释, 进行 Western Blot 检测。

## 2 结 果

**2.1 RV-NSP5 基因扩增** RV cDNA 经针对 NSP5 的特异引物进行体外扩增, 电泳结果表明, 605 bp 左右出现一明亮条带, 与预期片段大小一致 (图 1)。测序结果进一步表明, RV-NSP5 基因扩增成功。

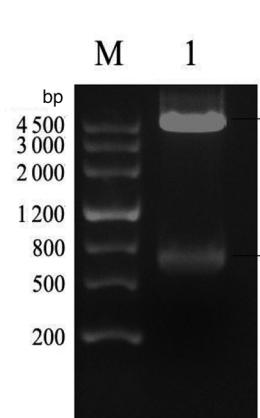
**2.2 重组载体的构建及鉴定** 扩增反应产物经过 DNA 胶回收纯化、酶切、再纯化及片段连接, 转化到 DH5 $\alpha$  中, 提取质粒后分别使用 EcoRI/XhoI 和 EcoRI/Xba I 进行双酶切验证, 得到的条带与理论大小相符 (图 2、3)。经测序结果证明, 所得序列与 NSP5 基因序列相一致, 表明 NSP5-pGEX-6P-1 和 NSP5-pFLAG-CMV-3 重组质粒构建成功 (图 4、5)。



1 为 RV-NSP5 目的片段

图 1 RV-NSP5 基因 PCR 产物电泳结果

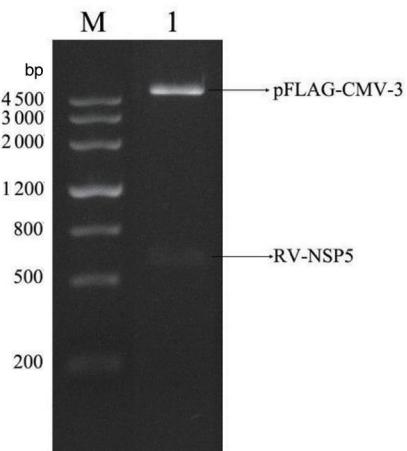
Fig.1 RV-NSP5 gene PCR product electrophoresis results



1 为 NSP5-pGEX-6P-1 质粒

图 2 Double restriction digestion identification of NSP5-pGEX-6P-1

Fig.2 Double restriction digestion identification of NSP5-pGEX-6P-1



1 为 NSP5-pFLAG-CMV-3 质粒

图 3 Double restriction digestion identification of NSP5-pFLAG-CMV-3

Fig.3 Double restriction digestion identification of NSP5-pFLAG-CMV-3

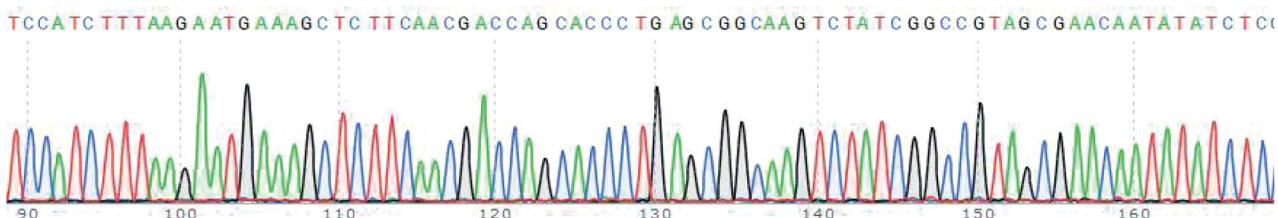


图 4 NSP5-pGEX-6P-1 的测序鉴定图(部分截图)

Fig.4 Sequencing identification map of NSP5-pGEX-6P-1 (partial screenshot)

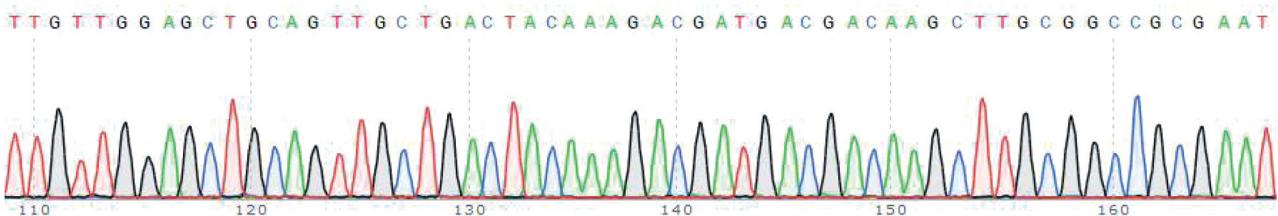


图 5 NSP5-pFLAG-CMV-3 的测序鉴定图(部分截图)

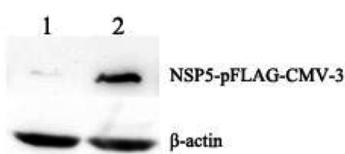
Fig.5 Sequencing identification map of NSP5-pFLAG-CMV-3 (partial screenshot)

2.3 Western blot 验证 NSP5-pFLAG-CMV-3 在细胞中的表达 NSP5-pFLAG-CMV-3 转染至 293T 细胞, 分析 NSP5 在细胞水平上的表达情况。由图所示, NSP5-pFLAG-CMV-3 转染后在约 25 kD 呈现特异条带, 符合理论大小, 而 pFLAG-CMV-3 空载体转染并没有出现条带(图 6)。

2.4 间接免疫荧光检测 NSP5-pFLAG-CMV-3 在细胞内分布 NSP5-pFLAG-CMV-3 转染至 293T 细胞之后在 37 °C 细胞培养箱中培养 48 h, IFA 结果表明, 转染 NSP5-pFLAG-CMV-3 的细胞能够观察

到荧光主要汇集在细胞质中, 细胞核并没有荧光; 转染 pFLAG-CMV-3 空载体没有呈现出特异性荧光(图 7)。

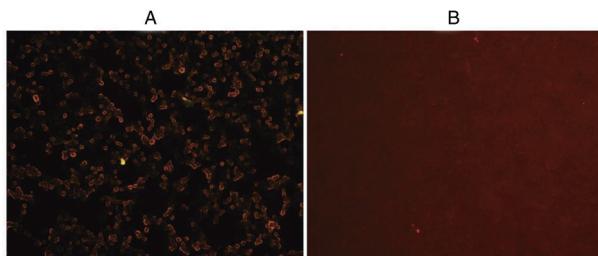
2.5 NSP5-pGEX-6P-1 优化表达、纯化及鉴定 经诱导条件摸索, 确定 NSP5-pGEX-6P-1 最适诱导条件为 37 °C、8 h、IPTG 0.4 mmol/L, 超声破碎获得上清液和沉淀悬液, 用于电泳及进一步的染色分析。结果表明, 在最适蛋白诱导条件下, NSP5-pGEX-6P-1 大部分是以包涵体形式富集于沉淀中表达, 而在上清的可溶性表达微乎其微(图 8A)。包涵体蛋



1 为转染 pFLAG-CMV-3 质粒;2 为转染 NSP5-pFLAG-CMV-3 质粒

图 6 NSP5-pFLAG-CMV-3 转染 293T 细胞的 Western Blot 检测

Fig.6 NSP5-pFLAG-CMV-3 transfected 293T cells detected by western blotting



A 为转染重组质粒 NSP5-pFLAG-CMV-3;B 为转染空载体 pFLAG-CMV-3 质粒

图 7 NSP5-pFLAG-CMV-3 的间接免疫荧光检测(50×)

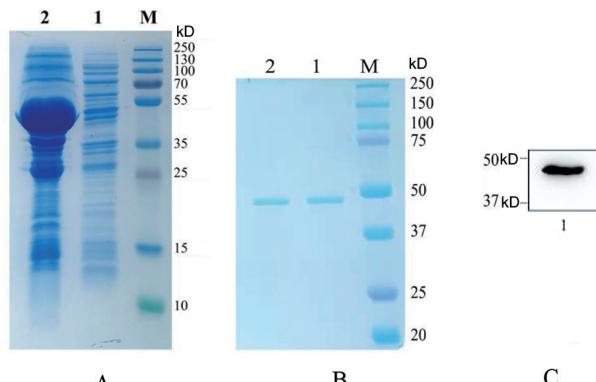
Fig.7 Indirect immunofluorescence detection of NSP5-pFLAG-CMV-3 (50×)

白在变性、复性之后,经 GST 琼脂糖树脂亲和层析洗脱,纯化所得的蛋白浓度为 0.92 mg/mL(图 8B)。经 Western Blot 检测,纯化的融合蛋白能被抗 GST 单抗特异性识别,且在 48 kD 左右处有一条特异性条带,符合预期大小(图 8C)。

### 3 讨 论

轮状病毒是全球高发的人兽共患病原体之一,约 95% 的婴幼儿在 5 岁前受过感染,此外也给畜牧业和世界经济造成了一定的损失<sup>[12]</sup>。由于该种病毒包装机制复杂,复制增殖功能会大大加强病毒的致病力,给卫生防控带来了很大的难度<sup>[13]</sup>。至今除了预防性减毒活疫苗外,尚无有效的药物及制剂可治疗轮状病毒,故从轮状病毒的基因成分入手,对病毒的致病机制、表达方式及与宿主间互作机理进行深入研究,从而为肠道类病毒的检测和治疗提供理论基础。

NSP5 是病毒基因组 11 片段编码的蛋白质,含有大量丝氨酸、苏氨酸等多种氨基酸的修饰位点,参与 RV 翻译后修饰及加工处理,对病毒的复制周期和蛋白表达调控有着举足轻重的作用<sup>[14]</sup>。基于反向遗传学技术的兴起,科学家尝试产生 NSP5 的稳



A: NSP5-pGEX-6P-1 菌体总蛋白裂解后分析:1 为裂解后的上清液;2 为裂解后的沉淀悬液;B: NSP5-pGEX-6P-1 纯化蛋白 SDS-PAGE 分析:1 和 2 为纯化所得的重组蛋白;C: NSP5-pGEX-6P-1 纯化蛋白的 Western Blot 检测:1 为纯化所得的重组蛋白

图 8 NSP5-pGEX-6P-1 的可溶性表达与纯化

Fig.8 Expression and purification of soluble NSP5-pGEX-6P-1

定反向互补系统以鉴定 NSP5 突变对 RV 病毒株的影响,结果发现 NSP5 过度磷酸化是装配圆形病毒质体的关键步骤,并且突出了 NSP5 的 C 末端尾巴在具有复制能力的病毒工厂形成过程中的关键作用<sup>[15-18]</sup>。随后,Buttafuoco 等<sup>[19]</sup>发现 NSP5 高表达是一个初始步骤,能够触发与 NSP2、VP2 结合形成胞质包涵体,可在病毒颗粒蛋白募集过程中起到“桥梁”作用,这便为蛋白互作影响病毒功能提供了有力的依据。由此表明,NSP5 非结构蛋白在病毒的复制和表达过程中起到非常重要作用,所以 NSP5 是如何加快病毒感染宿主并且协助逃避免疫监视将会是人类未来深入探讨的一大课题。

本次研究通过构建轮状病毒 NSP5 真核及原核表达系统,一方面通过转染真核细胞来研究重组质粒在细胞水平上的表达情况,为深入探究 NSP5 的功能与致病机理提供了新思路;另一方面,基于重组蛋白独特的属性,利用基因工程等方面的技术,摸索出最优化的表达条件,确定了重组蛋白富集在沉淀中,恰恰也验证了 Buttafuoco 等研究者的观点,并且顺利纯化 NSP5 蛋白,这为研制多抗提供了一定的前期基础。

**利益冲突:**无

**引用本文格式:**林家锋,陶晓莉,陆恒章,等. 轮状病毒 NSP5 克隆、鉴定、表达及其条件优化[J]. 中国人兽共患病学报,2021,37(8):703-708. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2021.00.092

**参考文献:**

- [1] Lopez S, Oceguera A, Jaime CS, et al. Stress response and translation control in rotavirus infection[J]. *Viruses*, 2016, 8 (6): 162. DOI: 10.3390/v8060162
- [2] Moutelikova R, Prodlalova J, Dufkova L, et al. Diversity of VP7, VP4, VP6, NSP2, NSP4, and NSP5 genes of porcine rotavirus C: phylogenetic analysis and description of potential new VP7, VP4, VP6, and NSP4 genotypes[J]. *Arch Virol*, 2015, 160(7): 1715-1727. DOI: 10.1007/s00705-015-2438-7
- [3] Komoto S, Fukuda S, Kugita M, et al. Generation of infectious recombinant human rotaviruses from just 11 cloned cDNAs encoding the rotavirus genome[J]. *J Virol*, 2019, 93(8): e02207-18. DOI: 10.1128/JVI.02207-18
- [4] 杨梅. 轮状病毒非结构蛋白与病毒复制相关性研究进展[J]. 临床儿科杂志, 2011, 29(9): 895-897. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3606.2011.09.027
- [5] Manuja BK, Prasad M, Gulati BR, et al. Comparative efficacy of immunological, molecular and culture assays for detection of group a rotavirus from faecal samples of buffalo (*Bubalus bubalis*) calves[J]. *Trop Anim Health Prod*, 2010, 42(8): 1817-1820. DOI: 10.1007/s11250-010-9642-y
- [6] Bwogi J, Jere KC, Karamagi C, et al. Whole genome analysis of selected human and animal rotaviruses identified in Uganda from 2012 to 2014 reveals complex genome reassortment events between human, bovine, caprine and porcine strains[J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0178855. DOI: 10.1371/journal.pone.0178855
- [7] Kung YH, Chi H, Liu CC, et al. Hospital-based surveillance of severe rotavirus gastroenteritis and rotavirus strains in young Taiwanese children[J]. *J Formos Med Assoc*, 2020, 119(7): 1158-1166. DOI: 10.1016/j.jfma.2020.03.019
- [8] Criglar JM, Hu L, Crawford SE, et al. A novel form of rotavirus NSP2 and phosphorylation-dependent NSP2-NSP5 interactions are associated with viroplasm assembly[J]. *J Virol*, 2014, 88(2): 786-798. DOI: 10.1128/JVI.03022-13
- [9] Kuzuya M, Fujii R, Hamano M, et al. Prevalence and molecular characterization of G1P human rotaviruses possessing DS-1-like VP6, NSP4, and NSP5/6 in Japan[J]. *J Med Virol*, 2014, 86 (6): 1056-1064. DOI: 10.1002/jmv.23746
- [10] Barbosa BR, Bemardes NT, Beserra LA, et al. Molecular characterization of the porcine group A rotavirus NSP2 and NSP5/6 genes from So Paulo State, Brazil, in 2011/12[J]. *Sci World J*, 2013, 2013: 241686. DOI: 10.1155/2013/241686
- [11] Zhou Y, Chen L, Du J, et al. MicroRNA-7 inhibits rotavirus replication by targeting viral NSP5 *in vivo* and *in vitro*[J]. *Viruses*, 2020, 12(2): 209. DOI: 10.3390/v12020209
- [12] Esona MD, Gautam R. Rotavirus[J]. *Clin Lab Med*, 2015, 35 (2): 363-391. DOI: 10.1016/j.cll.2015.02.012
- [13] Sharma S, Hagbom M, Svensson L, et al. The impact of human genetic polymorphisms on rotavirus susceptibility, epidemiology, and vaccine take[J]. *Viruses*, 2020, 12(3): 324. DOI: 10.3390/v12030324
- [14] Davy M, Malika O, Julie M, et al. Structural organisation of the rotavirus nonstructural protein NSP5[J]. *J Mol Biol*, 2011, 413: 209-221. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.08.008
- [15] Kanai Y, Kawagishi T, Nouda R, et al. Development of stable rotavirus reporter expression system[J]. *J Virol*, 2019, 93 (4): e01774-18. DOI: 10.1128/JVI.01774-18
- [16] Kanai Y, Komoto S, Kawagishi T, et al. Entirely plasmid-based reverse genetics system for rotaviruses[J]. *PNAS*, 2017, 114(9): 2349. DOI: 10.1073/pnas.1618424114
- [17] Papa G, Venditti L, Arnoldi F, et al. Recombinant rotaviruses rescued by reverse genetics reveal the role of NSP5 hyperphosphorylation in the assembly of viral factories[J]. *J Virol*, 2020, 94(1): e01110-19. DOI: 10.1128/JVI.01110-19
- [18] Sotelo PH, Schumann M, Krause E, et al. Analysis of rotavirus non-structural protein NSP5 by mass spectrometry reveals a complex phosphorylation pattern[J]. *Virus Res*, 2010, 149 (1): 104-108. DOI: 10.1016/j.virusres.2009.12.006
- [19] Buttafuoco A, Michaelsen K, Tobler K, et al. Conserved rotavirus NSP5 and VP2 domains interact and affect viroplasm[J]. *J Virol*, 2020, 94(7): e01965-19. DOI: 10.1128/JVI.01965-19

收稿日期:2021-02-05 编辑:王晓欢