



猪繁殖与呼吸综合征病毒 NADC30like 毒株 NSP4 蛋白晶体结构及功能解析

周雨¹, 赵飞帆¹, 赵贺盛⁴, 闫利明³, 李祥敏¹, 娄智勇^{3*}, 钱平^{1,2*}

(1. 华中农业大学农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室, 武汉 430070; 2. 华中农业大学洪山实验室, 武汉 430070; 3. 清华大学医学院和生命科学学院蛋白质科学重点实验室, 北京 100084; 4. 南开大学生命科学学院和药学院药物化学生物学国家重点实验室, 天津 300071)

摘要: 猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)是一种严重危害全球养猪业的重要病原体,其非结构蛋白NSP4作为3C样丝氨酸蛋白酶(3CLSP),在其他保守的结构域间连接处切割病毒多蛋白,在病毒的转录复制过程中发挥着关键作用。本研究旨在解析NSP4蛋白、结构特征及酶活性,为靶向NSP4的抗病毒小分子药物研发提供理论依据。本研究以PRRSV NADC30 like毒株为研究对象,通过克隆PRRSV *nsP4*基因至pGEX-6p载体,在大肠杆菌BL21(DE3)中诱导表达并纯化获得高纯度蛋白。利用悬滴法筛选结晶条件,结合X射线晶体学技术解析了NSP4的1.47 Å高分辨率晶体结构,并通过荧光共振能量转移体外测定其酶活性。结果显示,PRRSV NSP4由三个结构域组成:N端β桶结构域(I,残基12-69)、中间β桶结构域(II,残基89-153)和C端α/β结构域(III,残基159-190)。进一步通过活性位点预测,明确了NSP4的底物结合口袋由Ser-19、Met-20、His-39等关键残基构成,为基于结构的抑制剂设计提供了靶点。体外酶活试验表明,PRRSV NADC30 like毒株NSP4对底物的催化效率 K_{cat}/K_m 为 $411.38 \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$,且底物亲和力 $K_m = 23.28 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本研究报道了PRRSV NADC30 like毒株NSP4的高分辨率结构及酶动力学特征,为基于结构的抗病毒药物设计与筛选奠定了重要基础。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒;非结构蛋白;晶体结构;酶活性

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)02-0922-11

Crystal Structure and Function Analysis of NSP4 Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus NADC30-like Strain

ZHOU Yu¹, ZHAO Feifan¹, ZHAO Hesheng⁴, YAN Liming³, LI Xiangmin¹, LOU Zhiyong^{3*},
QIAN Ping^{1,2*}

(1. National Key Laboratory of Agricultural Microbial Resources Discovery and Utilisation, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Hongshan Laboratory, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 3. Key Laboratory of Protein Science, School of Medicine and Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 4. State Key Laboratory of Chemical Biology of Drugs, School of Life Sciences and School of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is a major pathogen that

收稿日期: 2025-05-16

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFD1800800)

作者简介: 周雨, 主要从事猪繁殖与呼吸综合征病毒相关研究, E-mail: 283588681@qq.com

* 通信作者: 钱平, 主要从事动物病原的感染与免疫机制、新型疫苗与诊断试剂、微生物资源发掘与新药创制以及猪病综合防控的研究, E-mail: qianp@mail.hzau.edu.cn; 娄智勇, 主要从事高致病性病毒感染和复制、与宿主相互作用过程中的分子机制, 以及对病毒生命过程进行调控的手段研究, E-mail: louzy@mail.tsinghua.edu.cn

poses a serious threat to the global swine industry. Its non-structural protein NSP4, as a 3C-like serine protease (3CLSP), cleaves viral multiproteins at the junctions between other conserved domains, playing a critical role in viral transcription and replication. This study aims to elucidate the structural features and enzymatic activity of the NSP4 protein, providing a theoretical basis for the development of antiviral small-molecule drugs targeting NSP4. This study used the PRRSV NADC30-like strain as the research object. The PRRSV *nsp4* gene was cloned into the pGEX-6p vector, induced for expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3), and purified to obtain high-purity protein. Crystallization conditions were screened using the drop-plate method, and the 1.47 Å high-resolution crystal structure of NSP4 was determined using X-ray crystallography. Its enzymatic activity was measured *in vitro* using fluorescence resonance energy transfer (FRET). The results showed that PRRSV NSP4 consists of three domains: the N-terminal β -barrel domain (I, residues 12-69), the middle β -barrel domain (II, residues 89-153), and the C-terminal α/β domain (III, residues 159-190). Further active site prediction identified the substrate-binding pocket of NSP4 as composed of Ser-19, Met-20, and His-39, providing a target for structure-based inhibitor design. *In vitro* enzyme activity experiments showed that the catalytic efficiency of PRRSV NADC30-like strain NSP4 toward the substrate, K_{cat}/K_m , was $411.38 \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$, and the substrate affinity, K_m , was $23.28 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. This study reports the high-resolution structure and enzyme kinetic characteristics of the PRRSV NADC30-like strain NSP4, laying an important foundation for structure-based antiviral drug design and screening.

Keywords: porcine reproductive and respiratory syndrome virus; non structural proteins; crystal structure; enzyme activity

* **Corresponding author:** QIAN Ping, E-mail: qianp@mail.hzau.edu.cn; LOU Zhiyong, E-mail: louzy@mail.tsinghua.edu.cn

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是一种严重危害全球养猪业的传染病。该病于 1987 年在北美首次被发现^[1], 并且 1990 年在欧洲被报道^[2]。其临床表现为母猪严重生殖衰竭和新生猪呼吸系统症状^[3]。PRRS 的病原为猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)。PRRSV 是单股、正链 RNA 包膜病毒, 与马动脉炎病毒 (equine arteritis virus, EAV)、乳酸脱氢酶升高病毒 (lactate dehydrogenase-elevating virus, LDV) 和猿猴出血热病毒 (simian hemorrhagic fever virus, SHFV) 同属动脉炎病毒科, 动脉炎病毒属^[4]。到目前为止, 已经描述了 PRRSV 的两种基因型: 基因型 1, 也称为欧洲型^[5]; 基因型 2, 即北美型^[6]。PRRSV 自从被发现以来, 在猪群中广泛存在, 2014 年 NADC30 like 毒株出现在中国之后, NADC30 like 毒株迅速成为中国主要流行的毒株, 导致生猪生产遭受重大经济损失^[7]。疫苗免疫是目前控制 PRRS

的主要手段, 然而 PRRSV 的适应性进化以及抗体依赖增强反应 (antibody dependent enhancement, ADE), 导致疫苗保护效果有限^[8]。基于现有疫苗效果不佳的现状, 小分子药物引起了极大的关注, 包括中草药^[9]、再利用药物^[10]和新化合物^[11]。

PRRSV 基因组长 15 kb, 包含至少 10 个开放阅读框 (open reading frame, ORF)^[12]。ORF 1a 和 1b 约占病毒基因组的 75%, 编码两个多聚蛋白 pp1a 和 pp1ab。通过病毒自身蛋白酶 (NSP1 α 、NSP1 β 、NSP2 和 NSP4) 的逐级切割, 最终产生 14 种非结构蛋白 (nonstructural protein, NSP)^[13]。结构蛋白的编码则主要由 ORF2 至 ORF7 基因组区域承担, 共产生 8 种结构组分, 具体为 GP2、E、GP3、GP4、GP5、ORF5a、M 和 N^[14]。非结构蛋白 NSP4 高度保守, 具有 3 个 C 样丝氨酸蛋白酶 (3CLSP) 活性^[15]。NSP4 作为参与多蛋白切割的 3CL 丝氨酸蛋白酶, 在复制过程中, PL1pro 和 PL2pro 蛋白酶切割 pp1a/pp1ab 的 N 近端区域, 而 3CLSP/3CL 蛋白酶在其他

保守的结构域间连接处切割病毒多蛋白^[16]。目前对 PRRSV NSP4 的研究主要集中在其在信号通路、细胞凋亡和相关活性酶中的作用。例如,PRRSV 对 poly (I-C) 诱导的 IFN- β 产生的抑制依赖于对 NF- κ B 信号通路^[17]的阻断;PRRSV NSP4 与线粒体内膜蛋白细胞色素 c1 (cyto. c1) 相互作用并诱导其蛋白水解切割,而 cyto. c1 的裂解 N 端片段具有凋亡活性^[18];NSP4 上调细胞胆固醇是 PRRSV 抑制宿主体内抗病毒先天免疫的一种策略^[19]。PRRSV *nsp4* 基因高度保守,在 PRRSV 感染早期可以检测到 NSP4 抗体^[20]。PRRSV NSP4 作为病毒的 3CLSP/3CL 蛋白酶是 PRRSV 主要蛋白酶之一,在病毒转录复制中发挥着至关重要的作用。然而,对于靶向 NSP4 以影响 PRRSV 复制的潜在抑制剂知之甚少。因此,本研究聚焦于 PRRSV NADC30 like 毒株 NSP4 的原核表达、结构解析及功能分析,以期为目标药物设计提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、毒株及载体

实验菌株:本试验所用的大肠杆菌克隆菌株 *E. coli* DH5 α 和表达菌株 *E. coli* BL21(DE3) 均购自北京全式金生物技术有限公司;实验毒株:PRRSV NADC30 Q 毒株由本实验室分离并保存;实验载体:原核表达载体 pGEX-6p 由本实验室保存。

1.2 试剂

PCR 反应试剂盒、DNA Gel Extraction Kit、质粒小量提取试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;GST 亲和介质购自美国 GE Healthcare 公司;晶体筛选试剂盒 Index I、Index II、Crystal Screen I、Crystal Screen II 购自 Hampton Research 公司;24 孔蛋白结晶悬滴板、CryoLoop 尼龙环购自上海迅晶生物公司。

1.3 克隆构建

1.3.1 引物的设计与合成 根据 PRRSV NADC30 Q 株的全基因序列,确定 PRRSV *nsp4* 目的基因序列目的片段为 612 bp,在目的片段两端分别插入 *Bam*H I / *Xho*I 的酶切位点,并设计上、下游引物,本文最终确定并设计的一对针对 PRRSV *nsp4* 的特异性引物,Primer-F: 5'-CTGTTCCA-GGGGCCCTGGGATCCGGCGCTTTTAGGAC-CCAAAAACC-3', Primer-R: 5'-GTCACGATG-CGGCCGCTCGAGTTATTCCAGTTCGGGTTT-

GGCAGCGAG-3',引物由北京擎科生物公司合成。

1.3.2 重组质粒的构建 以 PRRSV NADC30 Q 株全基因组的序列为模板,选用上述的引物,PCR 扩增 PRRSV *nsp4* 基因序列。反应条件为 98 $^{\circ}$ C,预变性 30 s;98 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,32 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,并参照诺唯赞琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书切胶回收目的基因片段。将胶回收产物与实验室保存的 pGEX-6p 载体进行双酶切连接,重组质粒转化至 TOP10 感受态中,并涂布在氨苄抗性的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取单克隆菌落扩大培养,用质粒提取试剂盒提取质粒,选择经 *Bam*H I 和 *Xho*I 双酶切鉴定正确的质粒,送至北京擎科生物科技有限公司测序。

1.4 蛋白的表达及纯化

将测序正确的重组质粒 pGEX-6p-*nsp4* 转化至 BL21 感受态细胞中,涂板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,挑菌至含有氨苄抗性的 LB 培养基的摇菌管中,将摇菌管置于 37 $^{\circ}$ C,220 r $\cdot$ min⁻¹ 条件下的摇床上过夜培养。将活化后的带有重组质粒的 BL21 感受态菌液,按照 1:200 的比例加入到含有氨苄抗生素的 LB 培养基中,置于 220 r $\cdot$ min⁻¹ 37 $^{\circ}$ C 条件的摇床上进行培养,至 OD=0.6。然后加入 IPTG,置于 180 r $\cdot$ min⁻¹ 16 $^{\circ}$ C 条件的摇床上诱导 3.5 h。

将诱导后的菌液在 3 600 r $\cdot$ min⁻¹ 条件下离心 10 min,弃上清,用 PBS 重悬菌液,并破碎菌体,离心收集上清。通过 GST 亲和层析初步纯化,纯化后产物加入 PreScission Protease (4 $^{\circ}$ C 过夜)切除 GST 标签。酶切后蛋白进一步通过 Superdex 75 凝胶过滤层析获得高纯度 PRRSV NSP4 蛋白。

1.5 蛋白的鉴定

纯化蛋白通过 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液处理后进行 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色分析,目的大小正确的条带送去清华大学质谱平台,进行肽质量指纹谱分析。

1.6 蛋白质结晶

纯化得到的 PRRSV NSP4 蛋白通过悬滴法结晶方法初步得到了 PRRSV NSP4 蛋白晶体,并进一步来筛选晶体生长条件,以此确定合适的结晶条件、蛋白质浓度、晶体生长温度以及结晶方法。将筛选的晶体置于防冻剂中并用液氮迅速冷冻蛋白质晶体并保存。

1.7 晶体数据收集

本试验中的晶体衍射数据收集是在上海同步

辐射光源的 BL02U1 线站完成的,衍射参数为波长 $0.98 \text{ \AA}$,光圈为 $50 \mu\text{m}$,曝光时间 0.1 s ,晶体与探测器之间的距离为 223 mm ,每隔 1 s 收集一张,每颗晶体总计收集 360 张衍射图,共收集到 720 张衍射图。使用上海光源线站内的 Aquarium 软件初步处理收集。采集到的晶体数据通过 XDS 软件包对 PRRSV NSP4 晶体衍射数据进行处理,初始模型选择率先解析的去除配体和水分子 PRRSV NSP4 的晶体结构(PDB ID: 3FAN),使用 Phenix 软件包中的 Phenix. phaser 程序进行分子置换(molecular replacement)解析结构。并通过 Coot 软件对结构进行修正,并通过 Phenix 软件包评估模型。

1.8 体外酶活测定

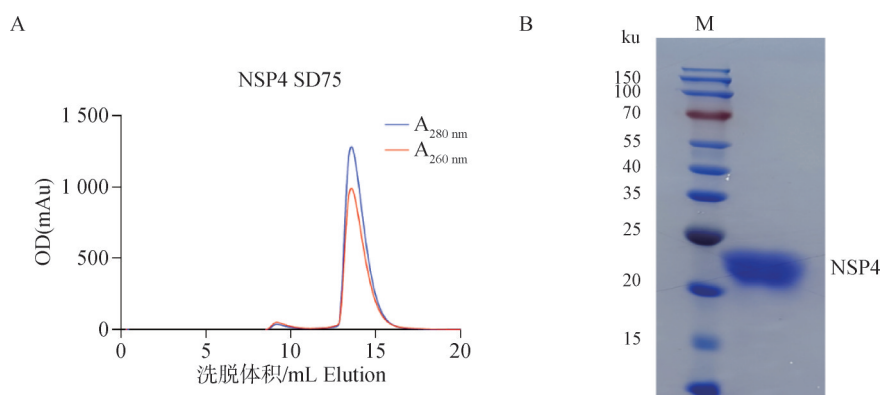
用于检测 PRRSV NSP4 蛋白酶活性的 FRET 底物为 MCA-GSLLEGAFRTQK-Dnp,该底物的多肽序列来源于 PRRSV NSP4 天然的 N 端自剪切序列(NSP3/NSP4),MCA 为供体基团,Dnp 为受体基团

(或称为淬灭基团),激发波长为 320 nm ,发射波长为 405 nm ,该底物合成于上海吉尔生化有限公司(GL Biochem),纯度大于 95% 。在固定酶浓度($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)条件下,测量不同底物浓度下($1, 3, 5, 10, 20, 30, 50, 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的催化反应初速度 V_0 。通过 GraphPad Prism 软件中非线性拟合曲线进行计算,得出表征酶动力学的一些特征常数 K_{cat} 和 K_{m} 的值。

2 结 果

2.1 PRRSV NSP4 蛋白的表达与纯化

本研究成功构建 PRRSV NSP4 大肠杆菌原核表达系统,并通过多步层析技术得到符合结晶条件的高纯度蛋白。结果显示(图 1A),在 14 mL 左右出现唯一一个狭窄的单峰,经 SDS-PAGE 及肽指纹鉴定鉴定,结果显示(图 1B)这个峰为 PRRSV NSP4 蛋白。表明蛋白能够正确表达,且蛋白样品纯度高,符合晶体生长需求。



A. PRRSV NSP4 蛋白 Superdex200 10/300 GL increase 分子筛层析结果图。横坐标显示洗脱体积,纵坐标对应 280 nm 波长下的紫外吸光值;B. 对应洗脱峰的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果,蛋白质条带均在 21.6 ku 左右

A. PRRSV NSP4 protein Superdex200 10/300 GL increase Plot of molecular sieve chromatography results. The horizontal coordinate shows the elution volume and the vertical coordinate corresponds to the UV absorbance value at 280 nm ; B. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis results corresponding to the elution peaks, and the protein bands were all around 21.6 ku

图1 PRRSV NSP4 蛋白表达纯化结果

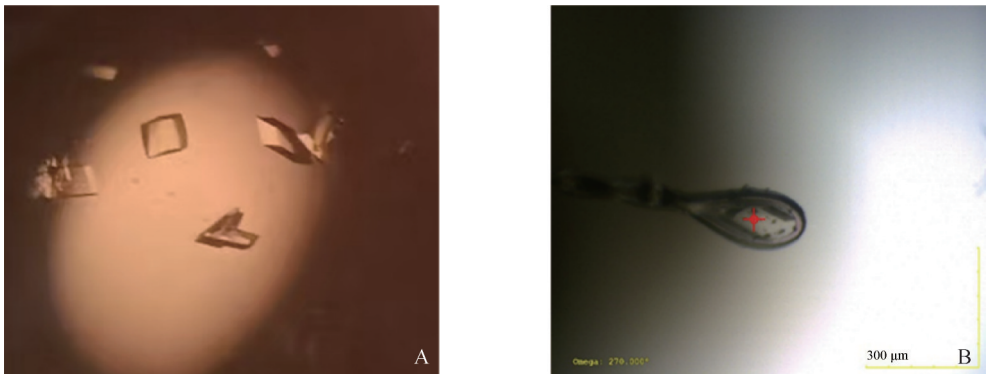
Fig. 1 Graph of PRRSV NSP4 protein expression purification results

2.2 PRRSV NSP4 蛋白结构解析

2.2.1 PRRSV NSP4 蛋白结晶筛选与优化 将纯化后的 PRRSV NSP4 蛋白溶液浓缩至 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,以 1:1 的体积比将蛋白样品与结晶池液混匀,通过悬滴法进行晶体生长条件的筛选。最终在结晶池液($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES sodium pH 7.5, $0.8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Sodium phosphate monobasic monohydrate, $0.8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Potassium phosphate monobasic)、温度 16°C 、蛋白与

池液比例 1:1 的结晶条件下,获得晶体外形良好和尺寸较大的蛋白晶体(图 2)。使用 CryoLoop 尼龙环捞出晶体,并迅速置于含有 20% 甘油的池液配制成的防冻液中浸泡数秒,转移至液氮冻存,用于后续晶体衍射试验。

2.2.2 PRRSV NSP4 结构解析和修正 通过 XDS 软件包对 PRRSV NSP4 晶体衍射数据进行处理。处理结果(表 1)显示空间群为 $C 2 1 1$,晶胞参



A. PRRSV NSP4 优化后的蛋白晶体,具体结晶条件是池液(0.1 mol·L⁻¹ HEPES sodium pH 7.5, 0.8 mol·L⁻¹ Sodium phosphate monobasic monohydrate, 0.8 mol·L⁻¹ Potassium phosphate monobasic)、结晶温度 16 ℃;B. 用于 X 射线衍射的 PRRSV NSP4 晶体

A. PRRSV NSP4 optimized protein crystals with specific crystallization conditions of pooling solution (0.1 mol·L⁻¹ HEPES sodium pH 7.5, 0.8 mol·L⁻¹ Sodium phosphate monobasic monohydrate, 0.8 mol·L⁻¹ Potassium phosphate monobasic) and crystallization temperature of 16 ℃; B. PRRSV NSP4 crystals for X-ray diffraction

图 2 PRRSV NSP4 蛋白晶体

Fig. 2 PRRSV NSP4 protein crystals

表 1 PRRSV NSP4 晶体衍射数据处理统计表

Table 1 PRRSV NSP4 crystal diffraction data processing statistics

参数名称 Parameter name	PRRSV NSP4
X 射线 X-ray	SSRF BL17U1
波长/Å Wavelength	0.979
分辨率范围/Å Resolution range	42.24~1.47(1.54~1.47)
空间群 Space group	C 1 2 1
晶胞参数 Cell parameters	
$a/\text{Å}, b/\text{Å}, c/\text{Å}$	111.43, 46.21, 42.25
$\alpha/^{\circ}, \beta/^{\circ}, \gamma/^{\circ}$	90, 110.91, 90
$R_{\text{merge}}/\%$	5.8
$I/\sigma I$	11.900
完整度/% Completeness	97.1
衍射点数目 Number of diffraction points	33 127
$R\text{-work}/R\text{-free}$	0.205 1/0.226 1
原子数目 Atom number	
蛋白质原子数 Atom number of protein	1 472
溶剂原子数 Atom number of solvent	69
平均 B 因子/Å ² Average B-factor	25.85
r. m. s. d	
键长/Å Bond length	0.005 8
键角/° Bond angle	0.87
拉式图 Ramachandran plot	
最适区/% Favored region	96.28
允许区/% Allowed region	3.72

数为 $a=111.43$, $b=46.21$, $c=42.25$, $\alpha=90^\circ$, $\beta=110.91^\circ$, $\gamma=90^\circ$; 整体数据的 R_{merge} 值为 5.8%, 信噪比为 11.1, 完整度为 97.1%。

通过结构解析获得 PRRSV NSP4 蛋白的三维

构象模型, 该模型包含一个由 192 个氨基酸残基组成的单体蛋白分子及 69 个配位水分子。 R -work 和 R -free 值由最初的 30.52% 和 32.38% 下降为 20.51% 和 22.61%。具体各项修正参数的统计值见表 2。

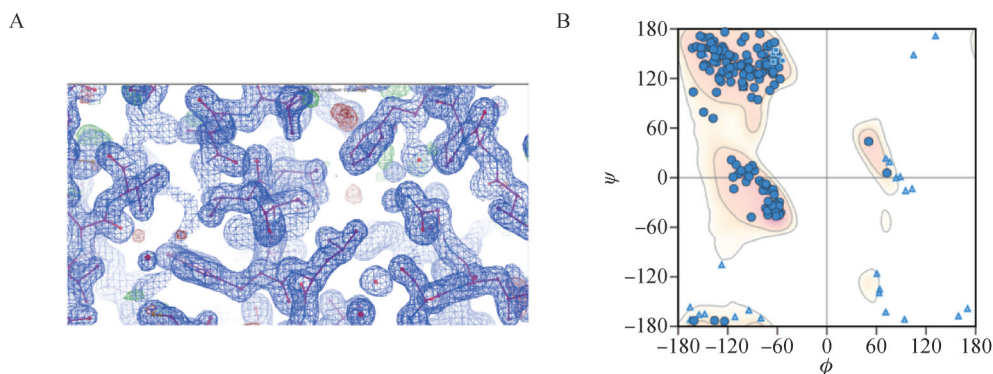
表 2 PRRSV NSP4 晶体结构修正结果

Table 2 PRRSV NSP4 crystal structure correction results

参数名称 Parameter name	PRRSV NSP4
分辨率范围/ $\text{\AA}$ Resolution range	38.82~1.47
衍射点数目 Number of diffraction points	33 127
R -work/ R -free	0.205 1/0.226 1
原子数目 Atom number	
蛋白质原子数 Atom number of protein	1 472
溶剂原子数 Atom number of solvent	69
平均 B 因子/ $\text{\AA}^2$ Average B-factor	25.85
r. m. s. d	
键长/ $\text{\AA}$ Bond length	0.005 8
键角/ $^\circ$ Bond angle	0.87
拉式图 Ramachandran plot	
最适区/% Favored region	96.28
允许区/% Allowed region	3.72

最终搭建的 PRRSV NSP4 蛋白质模型与电子密度吻合度良好, 能够明确的模拟主链和大部分侧链原子的位置。电子密度图(图 3A)分析表明, 氨基酸残基主链区域普遍呈现连续电子云分布特征, 同时多数侧链密度图可明确解析如图 3A 所示。

PRRSV NSP4 的拉式图(Ramachandran plot)分析显示(图 3B), 该模型 96.28% 的氨基酸残基分布于主链二面角优势区域(favored region), 3.72% 位于许可区域(allowed region), 未检测到位于不允许区域(disallowed region)的异常构象残基。



A. PRRSV NSP4 结构模型与电子密度图吻合度; B. PRRSV NSP4 的氨基酸残基二面角分布。浅粉色表示最适区, 浅黄色表示允许区, 白色表示不允许区

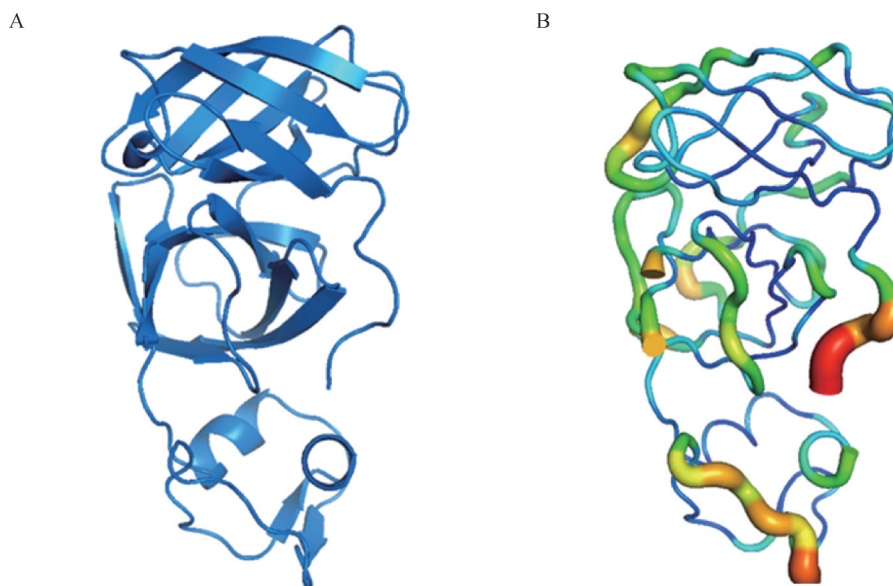
A. Agreement of PRRSV NSP4 structure model with electron density map; B. Dihedral angle distribution of amino acid residues of PRRSV NSP4. Light pink indicates the optimal zone, light yellow indicates the permissive zone, and white indicates the impermissible zone

图 3 PRRSV NSP4 结构修正结果

Fig. 3 Plot of PRRSV NSP4 structure correction results

在 PRRSV NSP4 结构模型中,该结构整体平均 B 因子为 $25.85 \text{ \AA}^2$,其分布特征符合典型蛋白动力学规律:核心区域 B 因子值相对较低,而溶剂暴露表

面及柔性结构域呈现适度升高的热运动参数,与预期构象柔性变化趋势一致(图 4)。



A. PRRSV NSP4 修正后的蛋白结构模型,以“Cartoon”形式呈现;B. PRRSV NSP4 修正后的蛋白结构模型的温度因子(B-因子)分布图,蓝色且细小代表温度因子低,红色且粗大代表温度因子高

A. PRRSV NSP4 modified protein structure model, presented in “cartoon” format; B. Temperature factor (B-factor) distribution of PRRSV NSP4 modified protein structural model, blue color and small size represent low temperature factor, and red color and large size represent high temperature factor

图 4 PRRSV NSP4 结构模型及温度因子分布图

Fig. 4 Structural model of PRRSV NSP4 and distribution of temperature factors

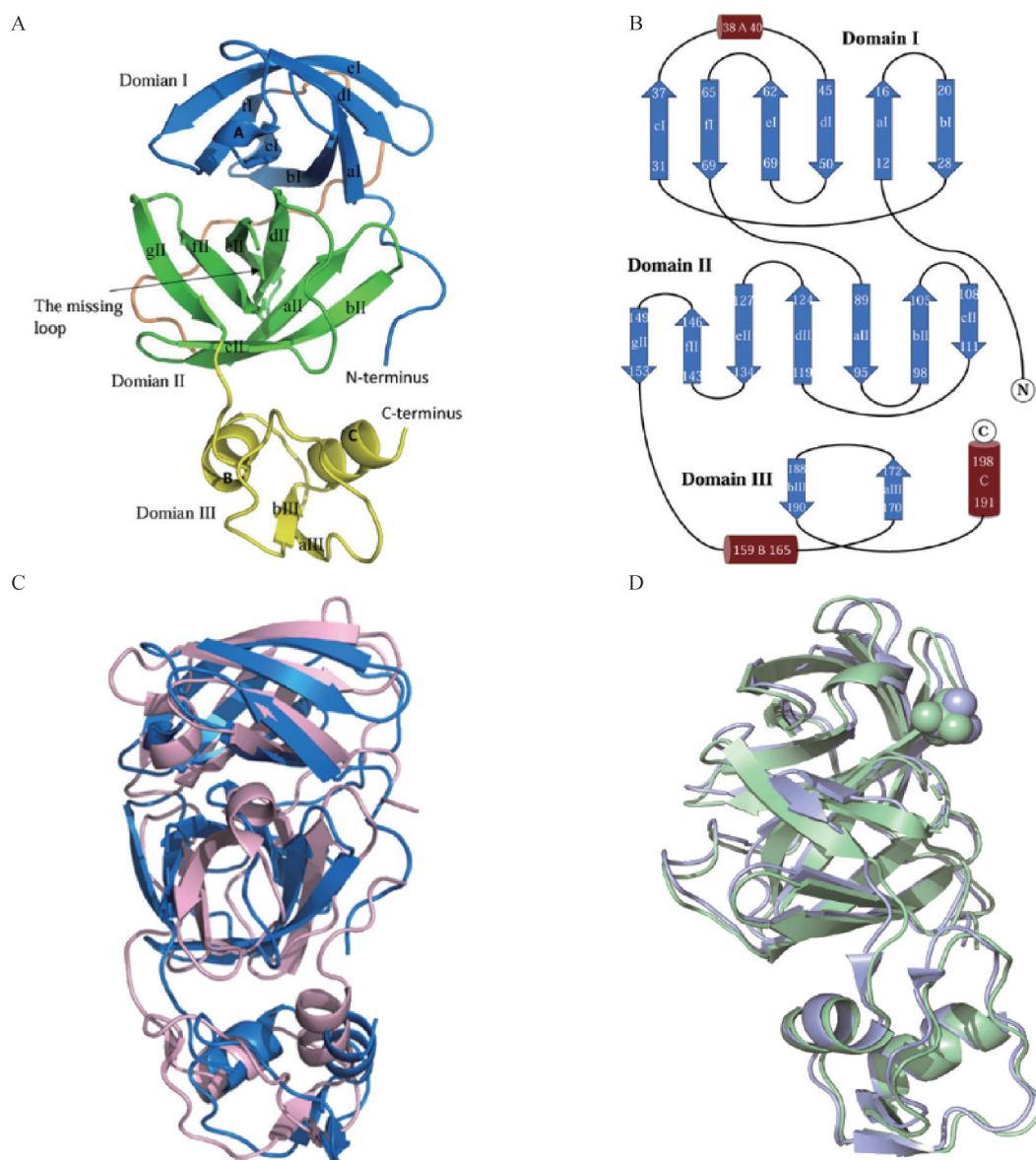
2.3 PRRSV NSP4 整体结构

PRRSV NSP4 蛋白结构分辨率为 $1.47 \text{ \AA}$,空间群为 C 1 2 1。每个不对称单位里面只有一个蛋白质分子。在 PRRSV NSP4 结构中,PRRSV NSP4 蛋白呈现典型的三结构域折叠模式:结构域 I(残基 12-69)、结构域 II(残基 89-153)及结构域 III(残基 159-190)。其拓扑结构包含两个反平行 β 桶核心域和一个 C 端 α/β 辅助结构域(图 5A)。结构域 I 由六条 β 链(aI-fI)构成反平行 β 桶,并通过短 α 螺旋(螺旋 A)形成桶状闭合结构。结构域 II 则包含七条 β 链(aII-gII),并通过一个跨越残基 69-89 的长环与结构域 I 相连(图 5A)。结构域 III(残基 159-198)由两段反平行 β 折叠(aIII-bIII)和两个 α 螺旋构成,其中螺旋 B 与螺旋 C 呈约 90° 交叉排列(图 5B)。此外,结构域 II 的 N 末端延伸出一条长环,其空间构象邻近结构域 III 区域。

通过蛋白质数据库(PDB)的 Dali 搜索功能,搜索出与本研究的结构具有显著结构相似性的各种蛋白质,其中 EAV NSP4 预计具有最高的 Z 分数

(21.1)。作为动脉炎病毒科中 NSP4 的原型结构, EAV 3CLSP 也折叠成三个结构域。将 PRRSV NSP4 整体结构域与 EAV NSP4 整体结构域进行叠加对边,结果见图 5 C,两者整体结构相似,但在局部有较大差别,两种蛋白酶中的结构域的空间位排列完全不同。分别用分别使用 PDBeFold(<http://pdbe.org/fold/>)和 PyMOL 分析均方根偏差(RMSD)显示 PRRSV NSP4 与 EAV NSP4 均方根偏差为 2.67,这也表明 PRRSV NSP4 与 EAV NSP4 的结构存在明显差异。PRRSV NSP4 蛋白质结构与参考结构 3FAN 进行了全原子(共 2 801 个原子)比对(图 5D)。整体结构相似但存在一定差异,均方根偏差(RMSD)为 $4.909 \text{ \AA}$ 。尤为突出的是,存在一个极端局部位移:原子编号 1 398 的位置偏差高达 $29.624 \text{ \AA}$,远超平均值。

本研究使用分子模拟详细分析了潜在的结合位点。将参考 EAV NSP4 的活性位点,同时使用 P2Rank 在线预测网站(<https://prankweb.cz/>)预测



A. PRRSV NSP4 整体结构以卡通形式展示。结构域 I 显示为蓝色, 结构域 II 显示为绿色, 结构域 III 显示为黄色; B. 相同的 PRRSV NSP4 结构以拓扑形式表示; C. PRRSV NSP4 (蓝色) 和 EAV NSP4 (浅粉色) 之间的结构对齐; D. PRRSV NSP4 和参考结构 3FAN 之间的结构对齐

A. The overall structure of PRRSV NSP4 is shown in cartoon form. Structural domain I is shown in blue, structural domain II in green, and structural domain III in yellow; B. The same PRRSV NSP4 structure is shown in topological form; C. Structural alignment between PRRSV NSP4 (blue) and EAV NSP4 (light pink); D. Structural alignment between PRRSV NSP4 and the reference structure 3FAN

图 5 PRRSV NSP4 晶体结构

Fig. 5 Crystal structure of PRRSV NSP4

了 PRRSV NSP4 的活性位点 (图 6)。PRRSV NSP4 的活性位点包括 His-39、Asp-64 和 Ser-118; 此外, S1 特异性口袋在动脉病毒 (PRRSV 和 EAV) 中是保守的, 包括 His-133 和 Ser-136, 对应于 EAV NSP4 的 His-134 和 His-137。在 PRRSV NSP4 中, 蛋白结合口袋由 Ser-19、Met-20、His-39、Asp-64、

Ala-114、Cys-115、Gly-116、Asp-117、Ser-118、Gly-135、Thr-134 组成。潜在的针对于 PRRSV NSP4 药物可能在该活性口袋通过氢键和疏水力与活性口袋相互作用, 从而阻断 PRRSV NSP4 发挥 3CLSP/3CL 蛋白酶和底物的识别和结合的作用, 从而抑制 PRRSV 复制。

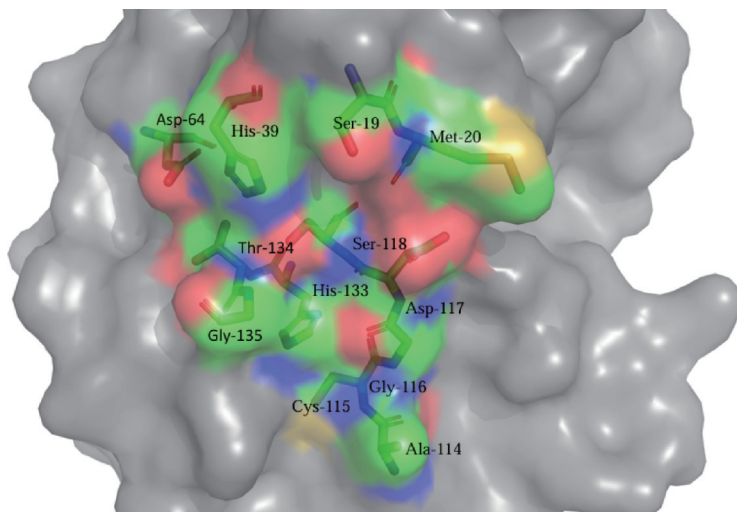


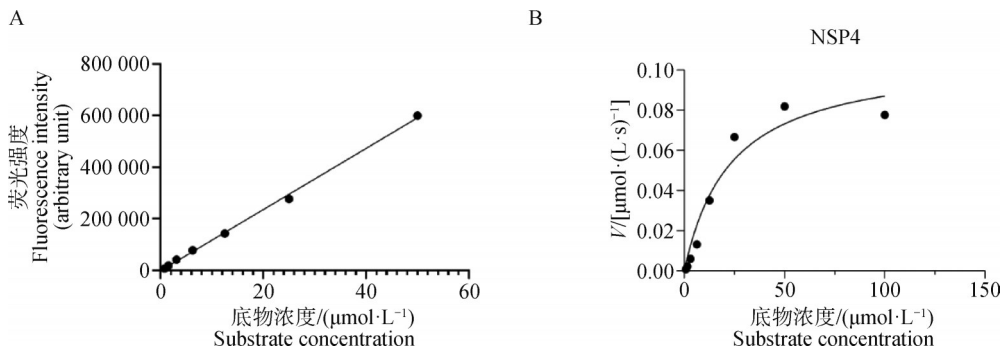
图6 PRRSV NSP4底物结合口袋

Fig. 6 PRRSV NSP4 substrate binding pocket

2.4 PRRSV NSP4酶活性检测

在固定酶浓度($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)条件下,测定不同浓度下($0.781\ 25$ 、 $1.562\ 5$ 、 3.125 、 6.25 、 12.5 、 25 、 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的荧光底物的荧光强度变化,用GraphPad Prism软件进行线性回归分析,得到荧光

强度与底物浓度之间的相应关系(图7A)。荧光强度与底物呈显著线性相关性:相关系数 $R^2=0.998\ 3$,相关系数大于 0.99 ,证实该检测体系在测试浓度范围内具有良好的线性响应特性。

A. 底物浓度与荧光值的标准曲线;B. 不同底物浓度下的催化反应初速度 V_0 。

A. Standard curve of substrate concentration versus fluorescence value; B. Initial velocity of catalytic reaction at different substrate concentrations V_0 .

图7 PRRSV NSP4酶活动力学曲线

Fig. 7 Mechanistic curve of PRRSV NSP4 enzyme activity

在本试验中,我们通过酶标仪来检测反应发生,我们通过米氏方程 $V=V_{\text{max}}\times[S]/(K_{\text{m}}+[S])$ 来表示反应过程。我们固定酶的浓度,测量不同底物浓度下的催化反应初速度 V_0 。试验数据显示(图7B),当底物浓度增至 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,反应速率达到平台期,表明体系接近最大反应速度(V_{max})。此时 V_{max} 为 $0.103\ 7 \mu\text{mol}\cdot(\text{L}\cdot\text{s})^{-1}$,我们得到PRRSV NSP4 K_{m} 值为 $23.28 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, K_{cat} 值为 $0.009\ 577 \text{ s}^{-1}$, $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 值为 $411.38 \text{ L}\cdot(\text{mol}\cdot\text{s})^{-1}$ 。

3 讨论

猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)给全球猪的健康和养猪业带来了巨大挑战。尽管过去三十年来业界为开发预防和治疗措施做出了广泛努力,但仍然缺乏对PRRSV的有效治疗方案。因此,迫切需要更加完善的策略来控制这种病毒。针对PRRSV结构蛋白及非结构蛋白作为抗病毒药物作用靶点开发小分子药物成为控制病毒的新的策略。

Zhu 等^[21]筛选出靶向 PRRSV 的非结构蛋白 11 (NSP11)的套式病毒目尿苷酸特异性内切核糖核酸酶(NendoU)结构域的小分子,该小分子可能作为一种有效的抗病毒药物,对抗由多种猪繁殖与呼吸综合征病毒株引起的感染,并可能作为广谱抗病毒药物用于其他套式病毒目的病毒。来源于黄芩的类黄酮化合物:黄芩素能抑制 PRRSV 感染,PRRSV 的囊膜糖蛋白 5(GP5)及基质蛋白(M)可能是黄芩素的潜在的结合靶点^[22]。对于套式病毒目病毒,3CLSP 和 3CL 蛋白酶是病毒复制的关键参与者^[23]。非结构蛋白 4(NSP4)是 3C 丝氨酸蛋白酶家族成员,具有裂解酶活性,负责 NSP3-NSP12 的加工,在 PRRSV 的生命周期和毒力中起关键作用^[24]。目前,对 PRRSV NSP4 的研究集中在其在信号通路和细胞凋亡的作用。然而,对于靶向 NSP4 影响 PRRSV 复制的潜在抑制剂知之甚少^[25]。因此,开发靶向 3CLSP 和 3CL 蛋白酶的抗病毒药物将成为预防 PRRSV 暴发的重要策略之一。Sha 等^[26]系统研究了过去 20 年中国 PRRSV-2 非结构蛋白 4 (NSP4)的遗传变异,不同毒株的 NSP4 表现出一定的氨基酸(85.8%~100.0%)和核苷酸序列相似性(81.0%~100.0%)。分析 NSP4 蛋白的空间结构,不仅为 NSP4 如何参与宿主先天反应的调控提供了理论依据,也为新药分子提供了合理的靶分子和结构。

本研究首先通过大肠杆菌原核表达系统得到了均一稳定的 PRRSV NSP4 蛋白。后续通过悬滴法得到 PRRSV NSP4 晶体。并通过 X 射线衍射在 1.47 分辨率下测定 PRRSV NSP4 的晶体结构。PRRSV NSP4 蛋白单体酶折叠成三个结构域,整体结构类似于马动脉炎病毒的同源蛋白酶,它与 PRRSV 一样,同属于套式病毒目动脉病毒科的成员。后续通过在线模拟以及同属病毒相对比,我们预测 PRRSV NSP4 蛋白结合口袋由 Ser-19、Met-20、His-39、Asp-64、Ala-114、Cys-115、Gly-116、Asp-117、Ser-118、Gly-135、Thr-134 组成。

本研究通过荧光共振能量转移试验,在体外合成能够被 PRRSV nsp4 水解切割的 NSP3-NSP4 底物多肽,测定 PRRSV NADC30 毒株 NSP4 体外水解酶活性。通过试验我们测得 NADC30 毒株 NSP4 的 K_m 为 $23.28 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, K_{cat} 值为 0.009577 s^{-1} , K_{cat}/K_m 为 $411.38 \text{ L}\cdot(\text{mol}\cdot\text{s})^{-1}$ 。

尽管已经确定了 PRRSV NSP4 的空间结构以

及蛋白活性口袋,但并没有一个针对 PRRSV NSP4 蛋白的特异性药物被设计筛选出来。本试验解析出 PRRSV NSP4 蛋白高分辨率结构,基于荧光共振能量转移技术,可以做到对 PRRSV NSP4 特异性小分子抑制剂的高通量筛选,对抗 PRRSV 药物研发提供理论依据。

4 结 论

克隆 PRRSV NADC30 like 毒株 nsp4 基因并表达、纯化获得高纯度 NSP4 蛋白。经解析,发现 PRRSV NSP4 由三个结构域组成:N 端 β 桶结构域(I, 残基 12-69)、中间 β 桶结构域(II, 残基 89-153)和 C 端 α/β 结构域(III, 残基 159-190)。活性位点预测表明 NSP4 的底物结合口袋由 Ser-19、Met-20、His-39 等关键残基构成。体外酶活试验表明,NSP4 对底物的催化效率 K_{cat}/K_m 为 $411.38 \text{ L}\cdot(\text{mol}\cdot\text{s})^{-1}$, 且底物亲和力 $K_m=23.28 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。PRRSV NADC30 like 毒株 NSP4 的高分辨率结构及酶动力学特征解析,为基于结构的抗病毒药物设计与筛选奠定基础。

参考文献(References):

- [1] NIELSEN H S, LIU G, NIELSEN J, et al. Generation of an infectious clone of VR-2332, a highly virulent North American-type isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *J Virol*, 2003, 77(6): 3702-3711.
- [2] HOPPER S A, WHITE M E, TWIDDY N. An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain [J]. *Vet Rec*, 1992, 131(7): 140-144.
- [3] STADLER J, ZOELS S, EDDICKS M, et al. Assessment of safety and reproductive performance after vaccination with a modified live-virus PRRS genotype 1 vaccine in pregnant sows at various stages of gestation [J]. *Vaccine*, 2016, 34(33): 3862-3866.
- [4] CAVANAGH D. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae [J]. *Arch Virol*, 1997, 142(3): 629-633.
- [5] WALKER P J, SIDDELL S G, LEFKOWITZ E J, et al. Changes to virus taxonomy and the statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020) [J]. *Arch Virol*, 2020, 165(11): 2737-2748.
- [6] CONZELMANN K K, VISSER N, VAN WOENSEL P, et al. Molecular characterization of

- porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group[J]. *Virology*, 1993, 193(1):329-339.
- [7] YANG Y, YAO L, WANG X, et al. Recombinant characteristics and pathogenicity of a novel PRRSV variant in weaned piglets derived from recombination of three clinical epidemic strains[J]. *Front Vet Sci*, 2024, 11:1496316.
- [8] LI J, MILLER L C, SANG Y. Current status of vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome: Interferon response, immunological overview, and future prospects[J]. *Vaccines (Basel)*, 2024, 12(6):606.
- [9] BELLO-ONAGHISE G, WANG G, HAN X, et al. Antiviral strategies of Chinese herbal medicine against PRRSV infection[J]. *Front Microbiol*, 2020, 11:1756.
- [10] CUI Z, LIU J, XIE C, et al. High-throughput screening unveils nitazoxanide as a potent PRRSV inhibitor by targeting NMRAL1[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1):4813.
- [11] ZHU J, HE X, BERNARD D, et al. Identification of new compounds against PRRSV infection by directly Targeting CD163[J]. *J Virol*, 2023, 97(5):e0005423.
- [12] LUNNEY J K, BENFIELD D A, ROWLAND R R. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: An update on an emerging and re-emerging viral disease of swine[J]. *Virus Res*, 2010, 154(1-2):1-6.
- [13] FANG Y, TREFFERS E E, LI Y, et al. Efficient-2 frameshifting by mammalian ribosomes to synthesize an additional arterivirus protein[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(43):E2920-E2928.
- [14] ALLENDE R, LEWIS T L, LU Z, et al. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions[J]. *J Gen Virol*, 1999, 80(Pt 2):307-315.
- [15] YE Z, ZHU Z, YU L, et al. Enhanced porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in Nsp4- or Nsp2-overexpressed Marc-145 cell lines[J]. *Vet Sci*, 2025, 12(1):52.
- [16] 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.
- [17] HUANG C, ZHANG Q, GUO X, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 4 antagonizes beta interferon expression by targeting the NF-kappaB essential modulator[J]. *J Virol*, 2014, 88(18):10934-10945.
- [18] ZHANG F, GAO P, GE X, et al. Critical role of cytochrome c1 and its cleavage in porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 4-induced cell apoptosis via interaction with nsp4[J]. *J Integr Agric*, 2017, 16(11):2573-2585.
- [19] KE W, ZHOU Y, LAI Y, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp4 positively regulates cellular cholesterol to inhibit type I interferon production[J]. *Redox Biol*, 2022, 49:102207.
- [20] TIAN X, LU G, GAO F, et al. Structure and cleavage specificity of the chymotrypsin-like serine protease (3CLSP/nsp4) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)[J]. *J Mol Biol*, 2009, 392(4):977-993.
- [21] ZHU J, LAI Y, CHENG M, et al. Discovery of small molecules against porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication by targeting NendoU activity[J]. *J Virol*, 2025, 99(2):e0203424.
- [22] WU J, LU Q, HOU J, et al. Baicalein inhibits PRRSV through direct binding, targeting EGFR, and enhancing immune response[J]. *Vet Res*, 2025, 56(1):16.
- [23] XUE X, YU H, YANG H, et al. Structures of two coronavirus main proteases: implications for substrate binding and antiviral drug design[J]. *J Virol*, 2008, 82(5):2515-2527.
- [24] ZHAO M, LV C, PANG J, et al. Establishment of an indirect ELISA detection method for porcine reproductive and respiratory syndrome virus NSP4[J]. *Front Microbiol*, 2025, 16:1549008.
- [25] WANG Z, XIAO C, HUANG W, et al. Discovery of Flavonol derivatives as porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2025, 121:130162.
- [26] SHA H, ZHANG H, LUO Q, et al. Variations in the NSP4 gene of the type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in China from 1996 to 2021[J]. *Virus Genes*, 2023, 59(1):109-120.

(编辑 白永平)