

## 猪源冠状病毒聚合酶基因的克隆及特性分析\*

李建强<sup>1,2</sup>, 柳纪省<sup>1\*\*</sup>, 程杰<sup>2</sup>, 兰喜<sup>1</sup>, 胡永浩<sup>2</sup>, 吴润<sup>2</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, 农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 甘肃兰州 730046; 2. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃兰州 730070)

### Cloning and Characterization of the Polymerase Gene of Porcine Coronavirus

LI Jian-qiang<sup>1,2</sup>, LIU Ji-xing<sup>1\*</sup>, CHENG Jie<sup>2</sup>, LAN Xi<sup>1</sup>, HU Yong-hao<sup>2</sup>, WU Run<sup>2</sup>

(1. Key laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, 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 polymerase gene, a non-structural gene from strain TS of transmissible gastroenteritis virus (TGEV), was amplified by RT-PCR primers designed based on the Purdue nucleotide sequence in GenBank. The expected 20054 bp product was obtained. The nucleotide sequence of ORF1 of TS shared nucleotide and amino acid identities of 98.8% and 99.0%, respectively with that of strain Pur46-MAD. The identity at the amino acid level for the ORF1 between TS and FIPV, PEDV, HCV299E, SARS was 87%, 57%, 57%, 45%, respectively. RdRp was regarded to have an important role in replication and the results indicated that it was a conserved protein. The data also showed that there was a ribosomal slippage site UUUAAC and three stem-loop structures in the ORF1a and ORF1b overlapping regions.

**Key words:** Porcine Coronavirus; Polymerase gene; Cloning; Characterization analysis

**摘要:** 参照 GenBank 中 Purdue 株序列对 TGEV TS 株聚合酶基因 (ORF1) 设计特异性引物, 经 RT-PCR 扩增获得了 20054bp 的片段, 与预期大小相符。TS 株与 Pur46-MAD 株的 ORF1 核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 98.8% 和 99.0%, 与 FIPV、PEDV、HCV299E 及 SARS 氨基酸同源性分别为 88%、57%、57% 和 45%。不同冠状病毒比较结果显示 RdRp 有很高的保守性而且重要的作用, 序列分析表明 TS 株在 ORF1a 和 ORF1b 重叠区有核糖体剪切位点 UUUAAC, 且相应区域 RNA 二级结构形成 3 个茎环结构。

**关键词:** 猪源冠状病毒; 聚合酶基因; 克隆; 特征分析

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)06-0551-05

猪传染性胃肠炎病毒 (Transmissible Gastroenteritis Virus of Swine, TGEV) 隶属于冠状病毒科冠状病毒属, 是引起猪腹泻的重要病原, 其引起的猪传染性胃肠炎 (TGE) 以对仔猪高度致死 (通常达 100%) 为特征<sup>[1]</sup>。截至目前, 我国大部分省市 (区) 均有本病流行, 并且呈上升趋势。TGEV 的基因组为不分节段的单股正链 RNA, 3' 端有 Poly(A), 基因组长约 28.5kb, 其编码 4 种结构蛋白 (S、M、sM 和 N) 和 3 种非结构蛋白 (ORF1、ORF3 和 ORF7)。过去对 TGEV 分子结构的研究主要集中在结构蛋白上, 而对非结构蛋白的研究较少, 我国对非结构蛋

白的研究尚未见报道。非结构蛋白聚合酶 (ORF1) 基因长约 20kb, 编码病毒的聚合酶, 由 ORF1a 和 ORF1b 组成, 分别含有 4017 和 2698 个密码子 (不包括终止子), 编码的多肽为 400kDa 和 350kDa; ORF1b 的转译是通过核糖体移码机制而实现的, 并有 43 个碱基重叠于上游阅读框 ORF1a 内<sup>[2]</sup>, 但截止目前对 TGEV 核糖体移码机制的发生还没有得到实验证明。2003 年德国科学家研究发现, TGEV 的蛋白酶与“非典”冠状病毒的蛋白酶有相同之处, 其运作方式很相似, 在对上述两种蛋白酶晶体结构进行分析的基础上建立了“非典”病毒蛋白酶的同簇模型<sup>[3]</sup>。

收稿日期: 2006-04-10, 修回日期: 2006-07-25

\* 基金项目: 重大基础研究“973”前期研究专项 (2004CCA00500)

作者简介: 李建强 (1979-), 男, 甘肃秦安籍, 在读博士, 研究方向为动物病毒分子生物学, E-mail: jianqiangli2003@sina.com.

\*\* 通讯作者: Correspondence Author. Tel: 13893626268, E-mail: liujisong@hotmail.com.

冠状病毒之间非结构蛋白聚合酶基因的同源性都在40%以上,而结构蛋白基因的同源性只有20%~30%左右<sup>[4]</sup>,所以进行冠状病毒聚合酶的研究对冠状病毒的演化分析有着重要的意义。本实验对TGEV TS株的聚合酶基因进行克隆与分析,以期对TGEV聚合酶的结构和功能研究提供分子基础,并为其其他冠状病毒的研究提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

TGEV TS毒株由中国农业科学院兰州兽医研究所传染病研究室提供。取冻存的病猪小肠刮取肠内容物, -70℃保存以备用。25日龄健康仔猪,购自兰州养猪场。*E.coli* JM109 菌株由兰州兽医研究所传染病研究室保存; pMD18-T载体购自宝生物工程(大连)公司。RNA提取试剂盒购自德国Q-Gene公司; DL2000 DNA Marker、IPTG、X-gal、氨苄青霉素、AMV反转录酶、RNA酶抑制剂、Premix Taq酶、dNTP、DNA凝胶纯化试剂盒及质粒小量提取试剂盒均为宝生物工程(大连)有限公司产品。

### 1.2 参考序列及登陆号

猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible Gastroenteritis Virus of Swine, TGEV): AJ271965, Z34093,

NC002306, Q91W06; 猫传染性腹膜炎病毒(*Feline Infectious Peritonitis Virus*, FIPV): AY994055、DQ010921, AAY16374, AAY16347; 猪流行性腹泻病毒(*Porcine Epidemic Diarrhea Virus*, PEDV): AAK38661, NP598309, Q91AV2; 人呼吸道冠状病毒(*Human Coronavirus 229E*, HCoV229E): NP073549, AAG48591, Q05002; 传染性非典型肺炎病毒(*Severe Acute Respiratory Syndrome Virus*, SARS): AAP41036, AAV91630, P59641; 鸡传染性支气管炎病毒(*Avian Infectious Bronchitis Virus*, AIBV): P27920; 鼠冠状病毒(*Murine Coronavirus*, MCoV): P16342; 牛冠状病毒(*Bovine Coronavirus*, BCoV): Q91A29。

### 1.3 病毒的增殖与收获

将冻存的肠内容物2mL投服于25日龄以内的健康小猪,当其出现发病症状或死亡以后取小肠肠内容物, 5000r/min 离心, 取上清于-70℃保存备用。病毒RNA的提取按RNA提取试剂盒说明操作。

### 1.4 引物的设计与合成

参照 GenBank 中 TGEV Purdue 株基因序列, 应用 Prime 5.0 软件分别设计用来扩增 ORF1a 的 5 对和 ORF1b 的 4 对特异性引物(见表1), 由上海生工公司合成。

表1 ORF1a 和 ORF1b 扩增引物及退火温度  
Table.1 Amplification primers and annealing for the ORF1a and ORF1b

Primers	Sequence of primer	Length(nt)	Annealing (°C)
A1S(1)	5'ACTTTTAAAGTAAAGTGAGTGTAGC3'	2 957	48
A1R(2957)	5'GTCACCACCACCCATTTTAT3'		
A2S(2933)	5'GTATAATAAAAATGGGTGGTG3'	2 053	48
A2R(4985)	5'AGCATCACGAAACCATAAT3'		
A3S(4948)	5'ATATAGATTGGCAAGCTCAT3'	2 529	48
A3R(7476)	5'CACTTTTGGAGACACAGAT3'		
A4S(7405)	5'CATTTAATGCTGCTGTAGGTTCA3'	2 665	46
A4R(10069)	5'ACACTAGGAAGGACAAAAGA3'		
A5S(10044)	5'TTTATGTCITTTTGTCTTC3'	2 342	48
A5R(12385)	5'TACTAACATGGTCTGGATCA3'		
B1S(12352)	5'TAGTGCAGCTCGACTAGAAC3'	2 271	48
B1R(14622)	5'TAACCTAAATCCGCATAATC3'		
B2S(14610)	5'GTGCTACAACAAAGATTATG3'	2 599	44
B2R(17208)	5'GGTACATTAGTTCCAACATT3'		
B3S(17176)	5'TGCTGTGGGATAATGTTG3'	2 230	48
B3R(19405)	5'TGCCTTACAATCTACAATGA3'		
B4S(19321)	5'CTTGGACGATTTTGTGACTA3'	1 075	48
B4R(20395)	5'TACGACCAAAACCACAATA3'		

### 1.5 RT-PCR 扩增

以提取的病毒RNA为模板, 分别以ORF1a和ORF1b相应片段下游引物为反转录引物按照AMV说明书合成cDNA。取3 μL cDNA、上下游引物各1 μL加入到25 μL的Premix Taq 中, 最后用灭菌去离子水将终体积调至50 μL。混匀后在PCR仪上进行扩

增, 退火温度见表2。扩增完毕后取5 μL 于10g/L琼脂糖凝胶电泳观察结果。

### 1.6 基因的克隆及鉴定

按DNA凝胶纯化试剂盒说明进行PCR产物回收。取PCR回收产物4.0 μL, Solution I 连接酶缓冲液5 μL, pMD18-T载体1 μL混匀后于16℃连接2 h。

连接产物按常规方法转化感受态大肠埃希氏菌 JM109。挑选白色菌落培养提取质粒, 并进行 PCR 鉴定和 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定。

### 1.7 重组质粒的核苷酸序列测定与分析

采用 Sanger's 双脱氧末端终止法对经酶切和 PCR 鉴定为阳性的重组质粒进行序列测定。由宝生物(大连)工程有限公司完成。根据测序结果应用 DNASTAR 等软件对 TGEV TS 株 ORF1 核苷酸序列及相应的氨基酸序列与 GenBank 中 TGEV Purdue 株及其他冠状病毒进行同源性比较并绘制进化树, 采用 BLAST 程序搜索与 TGEV TS 株氨基酸同源性高的其他冠状病毒序列, 并分析 TGEV TS 株的保守序列。

## 2 结果与分析

### 2.1 TGEV TS ORF1a 及 ORF1b 的 RT-PCR 扩增

分别用 ORF1a 的 5 对和 ORF1b 的 4 对引物进行 RT-PCR 扩增, 扩增结果与预期片段大小相符(见图 1)。

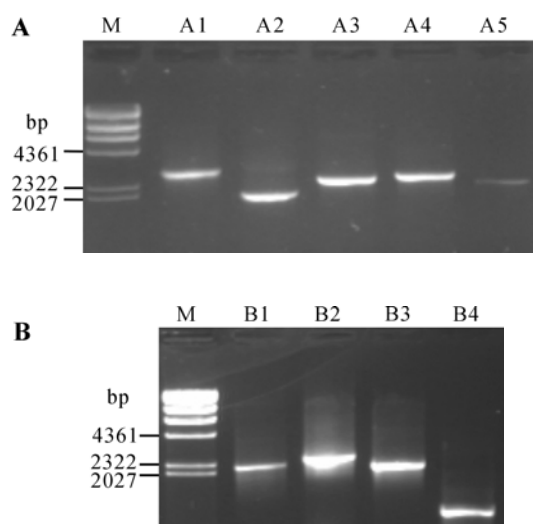


图 1 RT-PCR 扩增产物分析

Fig.1 RT-PCR products

A: ORF1a RT-PCR products. B: ORF1b RT-PCR products. M,  $\lambda$ -*Hind* III digest; A1/A2/A3/A4/A5, RT-PCR products; B1/B2/B3/B4, RT-PCR products.

### 2.2 PCR 产物的克隆与鉴定

以阳性质粒 DNA 作为模板进行 PCR, 扩增出预期大小的片段。将阳性质粒进行双酶切, 产生了与空载体和目的片段(由于目的片段中有酶切位点故将其切成两段或三段)大小相符的酶切片段(见图 2)。

### 2.3 序列的测定及拼接

根据设计引物在基因中的位置, 切除阳性克隆测序结果的重叠部分并依次连接, 经 BLAST 分析表明是 TGEV TS 株聚合酶基因的核苷酸序列, 长

为 20054bp, 由 ORF1a 和 ORF1b 组成(本序列已注册到 GenBank 中, 注册号为: DQ201447)。

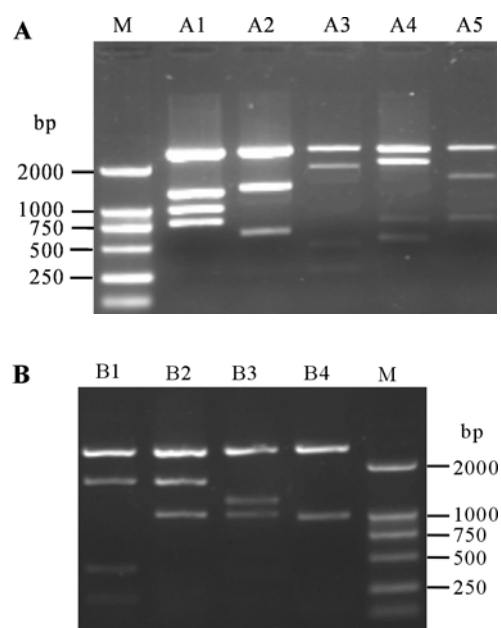


图 2 重组质粒酶切鉴定

Fig.2 Identifications of recombinant plasmid by RE

A: ORF1a products by *EcoR* I and *Hind* III; B: ORF1b products by *EcoR* I and *Hind* III. M, DL2000 DNA Marker; A1/A2/A3/A4/A5, Products; B1/B2/B3/B4, Products.

### 2.4 TS 株聚合酶基因的序列及其特性分析

2.4.1 TS 株聚合酶基因的同源性及其变异分析: 将获得的 TGEV TS 株聚合酶基因序列与 GenBank 上已发表的 Pur46-MAD 和 Purdue-115 的基因序列进行核苷酸和氨基酸同源性比较, 结果显示: TS 株与 Pur46-MAD、Purdue-115 株的聚合酶基因的核苷酸同源性分别为 98.8% 和 98.9%, 氨基酸的同源性分别为 99.0% 和 98.0%。TS 株聚合酶基因与 Pur46-MAD 株具有相等的核苷酸数, 而 Purdue-115 株在序列第 20369 处缺失一个碱基 C。将 TS 株与 Pur46-MAD 株进行变异分析, 发现两毒株的主要变异发生在 T 和 C 之间, 碱基的变异在 ORF1a 和 ORF1b 区域内均有发生, 在 ORF1a 区域内有 53 个氨基酸发生变异, 而 ORF1b 中只有 11 个氨基酸发生变异。TGEV TS 株聚合酶基因序列同其他冠状病毒比较结果发现, FIPV 与 TS 株聚合酶基因核苷酸序列同源性最高, 为 92%。为了进一步从基因水平上分析 TS 株聚合酶基因与其他冠状病毒的关系, 将 TS 株 ORF1 核苷酸序列参照 Pur46-MAD 基因组结构进行剪切后翻译成 ORF1ab 的氨基酸序列, 与 GenBank 中其他冠状病毒氨基酸序列比较, 结果显示, TS 株 ORF1ab 氨基酸序列与 FIPV 相应氨基酸同源性为 88%, 与 PEDV、CoVH229E 相应氨基酸的同源性均为 58%, 与 SARS 冠状病毒相应氨基酸

的同源性均为 45%；从整个比较图来看，其他冠状病毒 ORF1ab 氨基酸序列有明显的差别，而 6000bp 之后相应的氨基酸同源性明显升高。分析 TGEV 和其他冠状病毒系统进化树见图 3。

2.4.2 TS 株聚合酶基因的保守蛋白的分析：对冠状病毒属内部及正链 RNA 病毒范围内的不同蛋白的保守性研究发现非结构聚合酶蛋白中 RdRp、Hel、Unknow protein 2 (UP2)、P41、Unknow protein 3 (UP3) 等是相对保守的<sup>[4]</sup>，而上述蛋白恰好由 ORF1b 编码，基于这一思路，利用 DNASTar 软件 Jotun Hein 方法将 TGEV TS 株聚合酶裂解蛋白 RdRp、Hel、UP2、P41、UP3 与其他冠状病毒进行氨基酸序列保守性比较，结果见表 2。由表 2 可见，

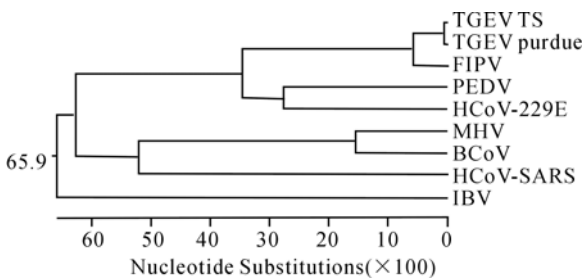


图 3 根据 TGEV 和其他冠状病毒的聚合酶基因氨基酸绘制系统进化树

Fig.3 The phylogeny tree drawn according to the amino acid of TGEV and other coronavirus

TGEV: Transmissible Gastroenteritis Virus of Swine; FIPV: Feline Infectious Peritonitis Virus; PEDV :Porcine Epidemic Diarrhea Virus; HCoV229E: Human Coronavirus 299E; MHV: Murine Hepatitis Virus; BCoV: Bovine Coronavirus; HCoV-SARS: Severe Acute Respiratory Syndrome Virus; AIBV: Avian Infectious Bronchitis Virus.

病毒前 6000bp 的碱基对应的氨基酸与 TS 株 TGEV TS 株 RdRp、Hel、UP2、UP3 蛋白与其他冠状病毒相应蛋白有很高的同源性，可见 RdRp、Hel、UP2、UP3 蛋白是冠状病毒的保守蛋白。

表 2 TGEV TS 株聚合酶部分裂解蛋白氨基酸序列与其他冠状病毒相应序列同源性比较 (%)

Table.2 Sequence similarity analysis of non-structural proteins between TGEV TS and other coronavirus (%)

	TGEV TS	FIPV	PEDV	H229E	SARS	AIBV	MCoV	BCoV
RdRp	99.0	95.9	75.4	74.6	59.2	59.3	58.2	58.3
Hel	99.7	98.7	74.0	74.7	61.9	59.1	60.2	59.3
UP2	99.8	99.0	72.4	72.0	53.8	50.0	51.8	52.0
P41	99.4	97.6	68.8	69.5	43.1	38.2	42.5	43.1
UP3	100	97.7	70.4	70.4	54.7	50.8	54.8	57.5

2.4.3 TS 株聚合酶基因的核糖体译码机制分析：TGEV TS 株克隆表明在全基因组序列第 12332~12338 处有核糖体剪切位点，其到 ORF1a 终止密码子 TAG 之间有 27 个碱基，当病毒聚合酶基因翻译 ORF1a 蛋白时，在核糖体剪切位点没有发生移码直接阅读到 ORF1a 终止密码子，翻译 ORF1ab 时在核糖体剪切位点 UUUAAAC 处发生移码，相当于在 UUUA 后插入了 UUUA 之后继续翻译，直至 ORF1 的终止密码子 TGA (如图 4)。核糖体剪切位点的 3' 端可以折叠形成一个 RNA 二级结构 (见图 5)。TGEV TS 株核糖体译码区 RNA 结构图显示该区域形成了碱基分别为 3、155 和 2 的环和碱基分别为 28、10 和 6 的茎结构，与 TGEV Purdue 株此区域 RNA 二级结构相比，剪切位点后第 20 个碱基由 C 变为 U 从而导致由 28 个碱基组成的茎产生了一个内环。

```

11994 AGTTCTACTGTTGATCAAAGTTATTTAAACGAGTGCGGGGTTTTAGTGCAGCTCGACTAG      12054 ORF1a
      S S T V D Q S Y L N E C G V L V Q L D .
11994 AGTTCTACTGTTGATCAAAGTTATTTATTTAAACGAGTGCGGGGTTTTAGTGCAGCTCGACTAGAA 12060 ORF1ab
      S S T V D Q S Y L F K R V R G F S A A R L E
  
```

图 4 TGEV TS 株核糖体移码机制发生区域核苷酸及氨基酸序列  
Fig.4 Nucleotide and acid sequence of the ribosomal frameshifting region

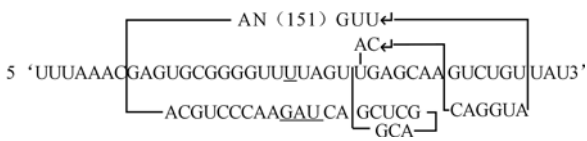


图 5 TGEV TS 株核糖体移码机制发生区域 RNA 结构  
Fig 5 Possible RNA structure of the ribosomal frameshifting region

### 3 讨论

TGEV 的聚合酶编码区占整个基因组序列长度的 2/3，其在整个冠状病毒属中有较高的保守性。截止目前对 TGEV 聚合酶基因的研究报道主要是以 Purdue 株为试验毒株。本实验是我国首次对 TGEV 聚

合酶全长进行的克隆与分析，试验结果显示 TGEV TS 株与 Purdue 株聚合酶有很高的同源性，其碱基的突变在 ORF1a 和 ORF1b 中均有发生，而氨基酸在 ORF1a 区域的变异明显高于 ORF1b 区域，值得注意的是 ORF1b 中 11 个氨基酸的变异有 7 个是发生在 RdRp 当中。在冠状病毒的众多不同蛋白中，RdRp 具有最重要的功能，它参与冠状病毒所特有的不连续的复制转录过程<sup>[5]</sup>，TGEV TS 株 RdRp 的变异是否影响其复制转录及毒力是一个值得研究的问题。将 TGEV TS 株与其他冠状病毒比较显示 TS 株聚合酶基因与其他冠状病毒有很高的同源性，而且 ORF1b 的保守性高于 ORF1a。TGEV、PEDV、FIPV、HCoV-229E、猪呼吸道冠状病毒 (Porcine respiratory coronavirus,

PRCoV)及犬冠状病毒(*Canine coronavirus*, CCoV)被列为是冠犬病毒 I 群, 进化树分析表明TGEV和FIPV亲缘关系最近, 而与冠状病毒 II 群的BCoV、MHV及冠状病毒 III 群的IBV关系较远, 而SARS与冠状病毒 II 群亲缘关系更相近, 与TGEV相比较远。

冠状病毒之间ORF1b是相对保守区域, 对TGEV TS株的ORF1b区进行保守性分析发现其RdRp、Hel、UP2和UP3区与其他冠状病毒(包括SARS冠状病毒)相应区域有很高的同源性。由此可见冠状病毒的保守区位于ORF1b中编码RdRp、Hel、UP2和UP3的区域。根据HIV治疗的经验, 药物靶蛋白往往产生抑制突变而使得药物分子失去作用<sup>[6]</sup>, 并且siRNA治疗中, 靶RNA的单点突变也会使治疗效果丧失<sup>[7]</sup>。这些提示, 在病毒治疗中以进化速率较慢的或高保守的病毒蛋白, 及高保守的基因组或RNA区域为药物靶, 将可能避免药物分子因靶蛋白的变异而产生的失效作用, 从而取得好的治疗效果。而对于SARS病毒治疗药物的研究就是建立在在对保守序列的研究上。由于SARS病毒的强传染性和高致病性, 故建立一种安全的SARS病毒聚合酶研究模型是很必要的。序列特征、二级结构及三维结构显示, SARS-RdRp同其它冠状病毒RdRp上的功能位点及结构具有较高的保守性, 这种保守性暗示着以往的以聚合酶作为靶分子进行药物分子设计的许多策略, 可以在SARS病毒药物设计中得到应用<sup>[8]</sup>。所以TGEV RdRp不仅是治疗TGEV药物的研究对象, 而且为建立一种安全的SARS药物研究模型带来了希望。对于尚不明确功能的UP2和UP3还需进一步研究。

冠状病毒的转录产物在翻译时利用特有的核糖体移码机制产生两个大小不同的多蛋白体ORF1a和ORF1ab, 然后这两个多蛋白体又被自身编码的蛋白酶水解以产生有功能的多肽<sup>[9]</sup>。TGEV TS株聚合酶基因编码4017个氨基酸长的ORF1a蛋白和6685个氨基酸长的ORF1ab蛋白, ORF1b的转译是通过核糖体移码机制而实现的, 推导氨基酸2678个, 表明ORF1b有33个碱基重叠在ORF1a区域内, 并非以前报道的有43个碱基重叠在ORF1a区域内。对IBV、

MHV和HCV229E核糖体译码机制研究发现, 核糖体译码机制的发生有两个条件即核糖体剪切位点UUUAAAC和此区域要形成两个或三个茎环结构<sup>[10]</sup>。实验证明TGEV TS株符合上述两个条件, 但对TGEV核糖体的移码机制还有待于进一步研究。

## References

- [1] Leman A D, Straw B, Glock R D, *et al.* Disease of Swine [C] 7th ed. Ames Iowa: Iowa State University Press, 1992, 6. 362-386.
- [2] Eleouet J F, Rasschaert D, Lambert P, *et al.* Complete sequence (20kilobase) of the Ployprotein-encoding gene1 of Transmissible Gastroenteritis Virus [J]. J Virol, 1995, 206: 817-822.
- [3] Anand K, Ziebuhr J, Wadhwani P, *et al.* Coronavirus Main Proteinase (3CL<sup>pro</sup>) Structure: Basis for Design of Anti-SARS Drugs [J]. Science, 2003, 300 (5626): 1763-1767.
- [4] Rota P A, Oberste M S, Monroe S S, *et al.* Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome [J]. Science, 2003, 300 (5624): 1394-1399.
- [5] Vliet A L, Smits S L, Rottier P J, *et al.* Discontinuous and no-discontinuous subgenomic RNA transcription in a nidovirus [J]. EMBO J, 2002, 21 (23): 6571-65801.
- [6] Armand D M, Gutierrez A, Clotet B, *et al.* HIV-1 Resistance to the gp41-dependent fusion inhibitor C-34 [J]. Antiviral Res, 2003, 59 (2): 137-142.
- [7] Prabu J M, Nalivaika E A, King N M, *et al.* Viability of a drug-resistant human immunodeficiency virus type1 Protease variant: structural insights for better antiviral therapy [J]. J Virol, 2003, 77 (2): 1306-1315.
- [8] Zhang D P, Wang J, Yang J, (张大鹏, 王进, 杨洁) *et al.* Conserved Motifs Mapping of the SARS-RdRp [J]. Chinese Journal of Virology (病毒学报), 2004, 20 (4): 371-377.
- [9] Anand K, Palm G J, Mesters J R, *et al.* Structure of coronavirus main proteinase reveals combination of a chymotrypsin fold with an extra  $\alpha$ -helical domain [J]. EMBO J, 2002, 21 (13): 3213-3224.
- [10] Herold J, Raabe T, Schelle P, *et al.* Nucleotide sequence of the Human Coronavirus 229E RNA polymerase locus [J]. Virology, 1993, 195: 680-691.