

兔出血症病毒衣壳蛋白 P 区二聚体的表达 及其与受体结合能力分析

胡波, 范志宇, 王芳*, 魏后军, 宋艳华, 仇汝龙, 徐为中, 薛家宾

(江苏省农业科学院兽医研究所·农业部兽用生物制品工程技术重点实验室·

国家兽用生物制品工程技术研究中心, 南京 210014)

摘要: 为检测兔出血症病毒(RHDV)衣壳蛋白(VP60)P区形成二聚体的能力及其与HBGAs受体结合的能力, 作者以pMD19T-VP60为模板扩增包含铰链区H的P区基因(HP)并克隆至原核表达载体pET28a(+)中, 转化大肠杆菌BL21(DE3)菌株, 经IPTG诱导表达, 获得HP蛋白。经SDS-PAGE和Western blot检测, 结果显示, HP蛋白主要以包涵体的形式高效表达, 经HisTrap亲和柱纯化后可形成二聚体结构。通过HBGAs受体结合试验表明, P区与完整病毒衣壳相似, 能与唾液中的HBGAs受体发生结合。本研究为进一步开展RHDV衣壳蛋白与受体的相互作用研究奠定基础。

关键词: 兔出血症病毒; 衣壳蛋白; P区; 组织血型抗原; 受体结合

中图分类号: S858.291; S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)02-0325-06

Expression of the P Dimer of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Capsid Protein and Analysis of Its Binding Ability to Receptor

HU Bo, FAN Zhi-yu, WANG Fang*, WEI Hou-jun, SONG Yan-hua,

QIU Ru-long, XU Wei-zhong, XUE Jia-bin

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology of Ministry of Agriculture /National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

Abstract: Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) is a member of the *Caliciviridae* family (*Lagovirus* genus). Similar to human norovirus (*Caliciviridae*, *Norovirus* genus), RHDV binds histo-blood group antigens (HBGAs) and this is thought to be important for infection. The aim of this study was to determine whether the P domain of RHDV capsid protein (VP60) could form dimers and to analyze its binding ability to HBGAs receptor. The P domain gene containing hinge (HP) was amplified and cloned into pET-28a (+) expression vector and introduced into *Escherichia coli* BL21 (DE3). The recombinant HP protein, confirmed by SDS-PAGE and Western blot, was effectively expressed in form of inclusion bodies by inducing with IPTG. The recombinant protein was then purified with HisTrap affinity chromatography, which could form dimers after purification. The HBGAs binding assay showed that the P domain bound H type HBGA with the same patterns as those of the intact viral capsids. Further structural studies with P domain are needed in order to better understand the HBGA binding mechanisms and virus-receptor

收稿日期: 2015-06-20

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-44); 江苏省农业科技自主创新资金项目[CX(13)5029]

作者简介: 胡波(1982-), 男, 江苏南京人, 助理研究员, 硕士, 主要从事畜禽疫病防控与兽医生物技术研究, Tel: 025-84390337, E-mail: hadi-si2002@163.com

* 通信作者: 王芳, 研究员, E-mail: rwangfang@126.com

interaction.

Key words: RHDV; capsid protein; P domain; HBGAs; receptor binding

兔出血症 (rabbit hemorrhagic disease, RHD) 是由兔出血症病毒 (RHDV) 引起的一种烈性病毒性传染病, 该病在全世界范围内广泛流行。RHDV 属杯状病毒, 无囊膜, 为单股正链 RNA 病毒^[1-2]。其含有两个开放阅读框 (ORF), 衣壳蛋白 VP60 位于 ORF1 的 3' 端, 基因长度为 1 740 bp, 编码 579 个氨基酸, 是病毒衣壳的最基本的单位, 与病毒的致病性和免疫原性密切相关^[2]。180 个 VP60 单体以二聚体的形式自聚成 RHDV 病毒样颗粒 (VLPs)^[2-3]。据 X 射线晶体研究^[3] 报道, VP60 主要分为三个区域: NTA (N 端臂, 1—65 aa)、框架区 (S 区, 66—229 aa)、突出区 (P 区, 238—579 aa) 和连接 S 与 P 区的铰链区 (Hinge, 230—237 aa)。S 区形成 VLPs 的内壳, P 区位于 VLPs 的外表面, 形成 VLPs 的刺突结构^[4]。P 区是宿主抗体识别及靶向的主要区域, 影响病毒的抗原性及病毒粒子与细胞受体的吸附作用, 该区域序列具有较高的变异性^[5-7]。

目前研究认为, 组织血型抗原 (HBGAs) 是 RHDV 的结合受体^[2]。K. Nyström 等^[8] 比较了各基因型 RHDV 与各型 HBGAs 结合的关系, 认为 HBGAs 是 RHDV 的结合因子, 并促进病毒的感染。进一步研究发现, RHDV 结合 ABH 组织血型抗原 (HBGAs), 并能与合成的 A 型和 H2 型多糖发生特异性结合, 且 RHDV 及其 VLPs 吸附成年兔呼吸道和消化道上皮细胞依赖于 HBGAs 的存在^[8-9]。缺乏正确 HBGAs 配体的兔能够抵抗低剂量 RHDV 的攻击^[8]。同属于杯状病毒的诺如病毒 (NVs) 与 RHDV 在晶体结构上十分相似, NVs 在侵染时也能够特异性识别并结合 HBGAs 受体, 其结合位点位于外表面的 P 二聚体或 P 亚区^[10-13], 并通过唾液 HBGAs 结合试验证实不同基因型 NVs 与不同型 HBGAs 具有多种结合模式^[14]。本研究构建表达含铰链区 H 的 VP60 P 区域, 对其能否形成二聚体结构进行研究, 并进一步分析其与受体 HBGAs 的结合能力, 将为 RHDV VLPs 的结构与功能的进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

质粒 pMD19-T-VP60 由本实验室构建并保

存^[15]; 表达载体 pET-28a(+) 由本实验室保存; *E. coli* DH5 α 感受态、*E. coli* BL21 (DE3) 感受态购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 主要试剂和工具酶

DNA Marker DL2000 及 DL15000、pMD19-T 载体、限制性内切酶 *Nde* I、*Hind* III、*T₄* DNA 连接酶、凝胶回收纯化试剂盒等购自 TaKaRa 公司; Pfx 高保真酶购自 Invitrogen 公司, 酶标山羊抗小鼠 IgG (HRP-IgG) 购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司, 四甲基联苯胺 (TMB) 购自 Sigma 公司; 96 孔酶标反应板购自南京赛研生物技术有限责任公司; 抗 VP60 P 区单克隆抗体 3D11 由本实验室制备并保存; H 型 HBGA 唾液样品由本实验室鉴定并保存; 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 兔出血症病毒 HP 基因的扩增

根据 GenBank 数据库 RHDV 中国皖阜株 VP60 序列 (FJ794180, RHDVa 型), 利用 Primer 5.0 软件设计合成一对扩增 HP 基因的特异性引物, 由 Invitrogen 公司合成, 上游引物 HP-F: 5'-TCGCATATGTCCAGCAA~~AA~~ACTGTTGACTC-3'; 下游引物 HP-R: 5'-GCCAAGCTTTCAGACATAAGAAAAGCC-3'。在上游引物的 5' 端引入 *Nde* I 酶切位点, 下游引物的 5' 端引入 *Hind* III 酶切位点。以本实验室构建保存的质粒 pMD19-T-VP60 为模板扩增 HP 基因。反应体系如下: 50 倍稀释的模板 1 μ L, 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 4 μ L, 50 mmol \cdot L⁻¹ MgSO₄ 2 μ L, 10 mmol \cdot L⁻¹ 上下游引物各 1 μ L, 10 \times Pfx Buffer 5 μ L, Pfx 高保真酶 0.4 μ L, 加 ddH₂O 至总体积 50 μ L; 然后执行下列反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 80 s, 30 个循环; 68 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 结束反应。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 胶回收试剂盒纯化后备用。

1.4 重组表达载体 pET-28a-HP 的构建

PCR 产物与 pET-28a 质粒同时进行 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切, *T₄* DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接 1 h 后, 转化 DH5 α 感受态细胞, 经双酶切鉴定, 获得重组表达载体 pET-28a-HP, 并送 Invitrogen 公司测序。

1.5 HP 蛋白的诱导表达

将重组质粒 pET-28a-HP 转化大肠杆菌 BL21

(DE3) 菌株,挑取单菌落接种到含卡那霉素 ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 LB 液体培养基中, 37°C 培养过夜,按 1 : 100 体积比将培养物接种于含卡那霉素抗性的新鲜 LB 液体培养基中,振荡培养至 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 值为 0.6 时,加入终浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG, 16°C 诱导表达过夜, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心收集菌体, PBS 重悬后冰浴超声破碎,分别收集上清和沉淀,进行 12% SDS-PAGE 电泳分析。

1.6 HP 蛋白的纯化及 Western blot 鉴定

按“1.5”的方法大量诱导表达 HP 蛋白,经超声破碎后,以含 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素的包涵体溶解液溶解沉淀,并用 HisTrap 亲和柱纯化目的蛋白质,具体操作按亲和层析柱说明书进行。将纯化后的 HP 蛋白透析去除尿素,所得产物进行还原和非还原 SDS-PAGE。采用半干转印法将蛋白质转移至 NC 膜,以针对 VP60 P 区的单抗 3D11 (1 : 1 000 稀释) 为一抗,HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1 : 5 000 稀释) 为二抗进行反应,ECL 显色观察结果。

1.7 HP 蛋白与受体 HBGAs 结合试验

利用已建立的 HBGAs 结合试验方法(参考诸如病毒与 HBGAs 结合试验^[16]建立)验证 HP 蛋白与受体 HBGAs 的结合。具体步骤:将含 H 型 HBGA 的唾液样品以 PBS (pH7.4) 按 1 : 1 000 稀释,包被 96 孔酶标板, 4°C 过夜后以 5% 的脱脂乳封闭 2 h, PBST 洗涤后加入 HP 蛋白, 37°C 孵育 1.5 h, 同时设 VLPs 阳性对照 (VP60^[15])、阴性对照 (pET28a 空载体诱导蛋白) 和空白对照 (PBS)。单抗 3D11 (1 : 2 000 稀释) 和 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1 : 5 000 稀释) 反应后以 TMBS 底物显色 10~15 min, $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ 终止反应,酶标仪上测定 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 值。

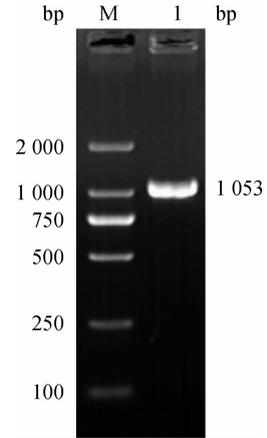
2 结 果

2.1 pET-28a-HP 重组表达载体的构建及鉴定

通过 PCR 扩增获得兔出血症病毒 HP 基因。经 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示,获得大小约为 1 053 bp 的目的片段(图 1)。PCR 产物经 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切后定向插入经相同酶切的 pET-28a (+) 载体中,经双酶切鉴定,获得重组表达载体 pET-28a-HP(图 2),测序结果表明其为 HP 基因,与皖阜株序列相似性为 100%。

2.2 HP 蛋白的表达及纯化

将重组质粒 pET-28a-HP 转化大肠杆菌 BL21

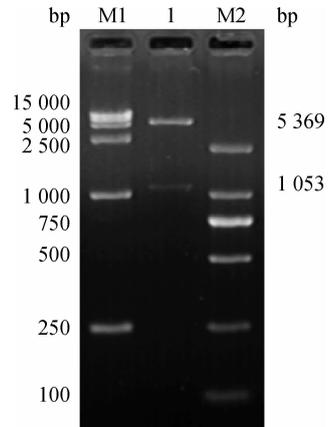


M. DNA 相对分子质量标准 (DL2000); 1. PCR 扩增的 HP 基因

M. DNA marker (DL2000); 1. PCR-amplified HP gene

图 1 HP 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 The amplified fragment of HP gene by PCR



M1. DL15000 DNA 相对分子质量标准; M2. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1. 重组质粒 pET-28a-HP 的 *Nde* I + *Hind* III 双酶切产物

M1. DL15000 DNA marker; M2. DL2000 DNA marker; 1. The products from recombinant plasmid pET-28a-HP digested with *Nde* I + *Hind* III

图 2 重组质粒 pET-28a-HP 的酶切鉴定

Fig. 2 Enzyme digestion identification of recombinant plasmid pET-28a-HP

(DE3) 菌株,经 IPTG 诱导表达,超声破碎后,上清和沉淀的 SDS-PAGE 电泳结果显示,在约 37 ku 处有一条明显的蛋白质条带,与预期大小一致。表明重组 HP 蛋白主要以包涵体形式表达,上清中几乎不表达。经 HisTrap 亲和柱纯化包涵体后,获得较纯净的目的蛋白质(图 3)。

2.3 HP 蛋白的鉴定

纯化的 HP 蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后,与还原 HP 样品 (+β 巯基乙醇) 相比,非还原 HP 样

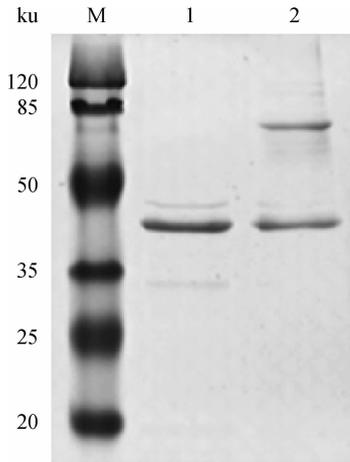
品($-\beta$ 巯基乙醇)在约 74 ku 处多出一条蛋白质条带(图 4 的 1、2 条带),经 Western blot 鉴定,结果显示,37 和 74 ku 处的蛋白质均为 HP 蛋白(图 4 的 3、4 条带),说明纯化后的 HP 蛋白可形成二聚体结构。

2.4 HP 与 HBGAs 结合检测

将 HP 蛋白做一系列梯度稀释后进行 HBGAs 结合试验。结果显示,随着 HP 蛋白浓度的增加,HP 蛋白与 H 型 HBGAs 结合反应的 OD_{450 nm} 值随之增大,而阴性和空白对照的 OD_{450 nm} 值均小于 0.2,表明 HP 蛋白能够与 H 型 HBGAs 发生结合(图 5)。

3 讨论

RHDV 衣壳蛋白 VP60 可自聚成 VLPs 并具有受体结合能力^[2]。根据 VP60 的基因型分析,RHDV 可分为 RHDV 经典型(G1-G5)、RHDV_a 型



M. 蛋白质相对分子质量标准;1. HP 蛋白(+ β)的 SDS-PAGE;2. HP 蛋白(- β)的 SDS-PAGE;3. HP 蛋白(+ β)的 Western blot;4. HP 蛋白(- β)的 Western blot

M. Protein marker;1. SDS-PAGE analysis of HP protein(+ β);2. SDS-PAGE analysis of HP protein(- β);3. Western blot analysis of HP protein(+ β);4. Western blot analysis of HP protein(- β)

图 4 HP 蛋白二聚体的鉴定

Fig. 4 Identification of dimerization with HP protein

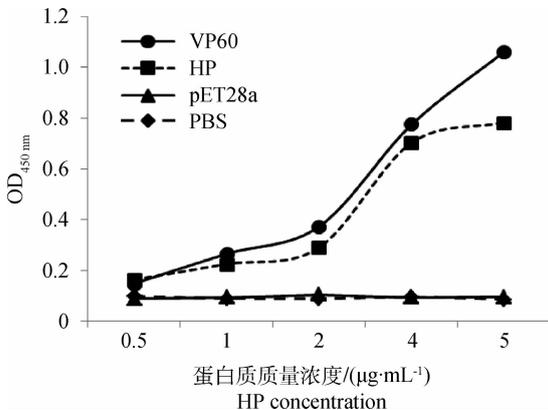
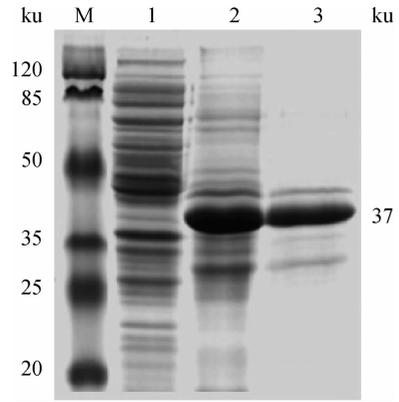


图 5 HP 蛋白与 H 型 HBGA 的结合情况

Fig. 5 Binding of HP protein to H type HBGA

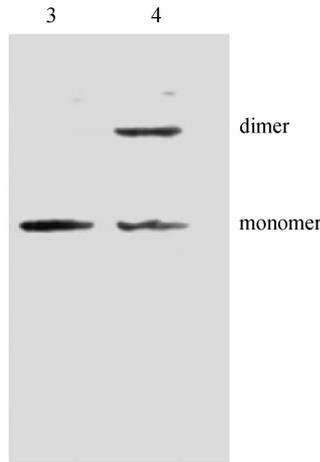


M. 蛋白质相对分子质量标准;1. 超声裂解上清;2. 超声裂解沉淀;3. 纯化后 HP 蛋白

M. Protein marker; 1. Supernatant of supersonic lysates; 2. Precipitation of supersonic lysates;3. Purified HP protein

图 3 HP 蛋白表达及纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression and purification of HP protein



M. 蛋白质相对分子质量标准;1. HP 蛋白(+ β)的 SDS-PAGE;2. HP 蛋白(- β)的 SDS-PAGE;3. HP 蛋白(+ β)的 Western blot;4. HP 蛋白(- β)的 Western blot

M. Protein marker;1. SDS-PAGE analysis of HP protein(+ β);2. SDS-PAGE analysis of HP protein(- β);3. Western blot analysis of HP protein(+ β);4. Western blot analysis of HP protein(- β)

图 4 HP 蛋白二聚体的鉴定

Fig. 4 Identification of dimerization with HP protein

(G6)和 RHDV_b 型(RHDV2),且经典型 RHDV 与 RHDV_a 的相似性明显高于 RHDV_b 与前两者的相似性^[17-19]。中国流行株除国内外首次暴发的毒株 WX84 外,均为 RHDV_a 型^[20]。RHDV_a 型毒株衣壳蛋白的 S 区高度保守,P 区可进一步分为 P1 亚区(238—286、450—466、484—579 aa)和 P2 亚区(287—449、467—483 aa)。P2 亚区位于病毒衣壳表面,含有病毒株特异性抗原表位和红细胞结合位点,其变异程度高于 P1 亚区^[3]。

近年来研究认为 HBGAs 是 RHDV 的结合受体,在宿主 RHD 感染中起重要作用。前期研究发现从感染兔肝提取物中的天然 RHDV 和重组病毒

衣壳蛋白均发现能够特异性地结合 HBGAs 多糖,并黏附于成年兔的上呼吸道、消化道上皮细胞^[8-9]。之后通过核磁共振试验证实了在 RHDV 与 HBGAs 结合中,HBGAs 上的 L-岩藻糖是 RHDV-VLPs 最小的识别结构^[21]。但 RHDVa-VLPs 上 P 区所形成的刺突结构是否包含了与受体 HBGAs 结合的所有要素,以及 P 区上哪些氨基酸组成了 HBGAs 的结合域却并不明确。由于同属杯状病毒的诺如病毒(NVs)受体也为 HBGAs,因此 X. Wang 等^[3]在通过冷冻电子显微镜和晶体学等方法解析了 RHDVa 型病毒的结构后,将其与 NVs 晶体结构尤其是受体结合部位的结构进行了比较,发现 RHDVa 不具有 NVs 上与 HBGAs 相互作用的结合域,两者与 HBGAs 的结合方式完全不同,并推测病毒表面的腔洞样结构可能与受体结合有关。而在 NVs 受体研究中,不同基因型的 NVs 就能够结合不同型的 HBGAs 受体,该结合与 P2 亚区的 RGD/NGR 样结合域有关,但不同型的结合位点并不完全相同^[14],同时研究表明形成颗粒结构的 P 蛋白比 P 二聚体及单体具有更强的受体结合能力^[22]。在 RHDVb 型病毒的研究中,M. M. Leuthold 等^[23]通过 X 射线晶体学方法发现,HBGAs 结合于 RHDVb 型病毒表面 P 区所形成的二聚体的交界面处,且 P 区的几个保守位点与结合密切相关。由于 RHDVb 所具有的独特基因型和抗原性,且 RHDVb 衣壳蛋白基因与经典型 RHDV 和 RHDVa 的相似性甚至低于兔杯状病毒(RCV)与后两者之间的相似性,因此也有学者认为 RHDVb 不属于 RHDV 的突变株,而是一种新发现的兔病毒^[19]。由此推测,RHDVa P 蛋白有形成多聚体的可能,且 RHDVa 和 RHDVb 与受体 HBGAs 的结合模式可能不同。为研究 RHDVa 表面氨基酸与受体 HBGAs 的结合域,RHDVa 病毒衣壳蛋白外表面的 P 区是最佳对象。

本研究选择皖阜株 RHDV(RHDVa 型)作为代表研究 RHDVa 与 HBGAs 的结合。采用 pET28a(+)表达载体和 *Nde* I、*Hind* III 插入位点以保证所表达的 HP 蛋白上除 His 标签和 thrombin 裂解位点外,无其他外源氨基酸。经 Western blot 检测表明,包含铰链区 H 的 P 蛋白可以形成二聚体结构。结合试验证实,P 区与完整病毒衣壳相似,能与 H 型 HBGA 发生结合。这表明 RHDVa 衣壳蛋白形成的 VLPs 结构对于 HBGAs 受体的结合是非必需

的,且 P 区中包含受体结合中必不可少的氨基酸组成和结构特征。但 P 区二聚体的形成是否增强了 P 蛋白与受体 HBGAs 的结合力尚有待进一步研究。以上结果表明所表达的 P 区的结构特征对于 RHDV 衣壳蛋白与 HBGAs 受体的相互作用的研究具有重要意义,原核表达的 P 区可作为病毒与受体相互作用研究的模型。

4 结 论

成功构建兔出血症病毒 HP 基因的表达质粒,并验证 HP 蛋白的表达,证实包含铰链区 H 的 P 蛋白能形成二聚体结构。HBGAs 受体结合试验证明 HP 蛋白与完整 VLPs 相似,能与唾液中的 HBGAs 受体发生结合。这表明 HP 蛋白可替代 VLPs 作为研究受体结合的模型。

参考文献(References):

- [1] MITRO S, KRAUSS H. Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology [J]. *Eur J Epidemiol*, 1993, 9(1): 70-78.
- [2] ABRANTES J, VAN DER LOO W, LE PENDU J, et al. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review [J]. *Vet Res*, 2012, 43: 12.
- [3] WANG X, XU F, LIU J, et al. Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(1): e1003132.
- [4] LAURENT S, VAUTHEROT J F, LE GALL G, et al. Structural, antigenic and immunogenic relationships between European brown hare syndrome virus and rabbit haemorrhagic disease virus [J]. *J Gen Virol*, 1997, 78(Pt 11): 2803-2811.
- [5] ESTEVES P J, ABRANTES J, CARNEIRO M, et al. Detection of positive selection in the major capsid protein VP60 of the rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) [J]. *Virus Res*, 2008, 137(2): 253-256.
- [6] KINNEAR M, LINDE C C. Capsid gene divergence in rabbit hemorrhagic disease virus [J]. *J Gen Virol*, 2010, 91(Pt 1): 174-181.
- [7] ROHAYEM J, BERGMANN M, GEBHARDT J, et al. Antiviral strategies to control calicivirus infections [J]. *Antiviral Res*, 2010, 87(2): 162-178.
- [8] NYSTRÖM K, LE GALL-RECUÉ G, GRASSI P, et al. Histo-blood group antigens act as attachment fac-

- tors of rabbit hemorrhagic disease virus infection in a virus strain-dependent manner [J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(8):e1002188.
- [9] RUVOËN-CLOUET N, GANIÈRE J P, ANDRÉ-FONTAINE G, et al. Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family[J]. *J Virol*, 2000, 74(24):11950-11954.
- [10] HUANG P, FARKAS T, MARIONNEAU S, et al. Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens; identification of 4 distinct strain-specific patterns [J]. *J Infect Dis*, 2003, 188(1):19-31.
- [11] CAO S, LOU Z, TAN M, et al. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus[J]. *J Virol*, 2007, 81(11):5949-5957.
- [12] TAN M, MELLER J, JIANG X. C-terminal arginine cluster is essential for receptor binding of norovirus capsid protein[J]. *J Virol*, 2006, 80(15):7322-7331.
- [13] CHEN Y, TAN M, XIA M, et al. Crystallography of a Lewis-binding norovirus, elucidation of strain-specificity to the polymorphic human histo-blood group antigens[J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(7):e1002152.
- [14] TAN M, HUANG P, MELLER J, et al. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket [J]. *J Virol*, 2003, 77(23):12562-12571.
- [15] CHEN M, SONG Y, FAN Z, et al. Immunogenicity of different recombinant rabbit hemorrhagic disease virus-like particles carrying CD8⁺ T cell epitope from chicken ovalbumin (OVA) [J]. *Virus Res*, 2014, 183:15-22.
- [16] TAN M, HEGDE R S, JIANG X. The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to his-
to-blood group antigen receptors [J]. *J Virol*, 2004, 78(12):6233-6242.
- [17] HUKOWSKA-SZEMATOWICZ B, TOKARZ-DEPTULA B, DEPTULA W. Genetic variation and phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) strains [J]. *Acta Biochim Pol*, 2012, 59(4):459-465.
- [18] PUGGIONI G, CAVADINI P, MAESTRALE C, et al. The new French 2010 rabbit hemorrhagic disease virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*) [J]. *Vet Res*, 2013, 44:96.
- [19] LE GALL-RECUÉ G, LAVAZZA A, MARCHANDEAU S, et al. Emergence of a new lagovirus related to rabbit hemorrhagic disease virus [J]. *Vet Res*, 2013, 44:81.
- [20] WANG X, HAO H, QIU L, et al. Phylogenetic analysis of rabbit hemorrhagic disease virus in China and the antigenic variation of new strains [J]. *Arch Virol*, 2012, 157(8):1523-1530.
- [21] RADEMACHER C, KRISHNA N R, PALCIC M, et al. NMR experiments reveal the molecular basis of receptor recognition by a calicivirus [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(11):3669-3675.
- [22] TAN M, JIANG X. The P domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors [J]. *J Virol*, 2005, 79(22):14017-14030.
- [23] LEUTHOLD M M, DALTON K P, HANSMAN G S. Structural analysis of a rabbit hemorrhagic disease virus binding to histo-blood group antigens [J]. *J Virol*, 2015, 89(4):2378-2387.

(编辑 白永平)