

诺瓦克病毒 ORF2 的原核表达及其产物分析

王大鹏^{1,2,3} 吴清平^{2*} 姚琳^{1,2,3} 寇晓霞² 张菊梅²

(1. 中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

(2. 广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

(3. 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要: 诺瓦克病毒(Norovirus, NV)是1972年在美国首次发现的新生病毒,直到1995年国内才有报道。该病毒是严重危害人类健康的重要食源性病毒,可导致不同年龄阶段人群的急性病毒性腹泻。实验以提取临床NV阳性腹泻样本的基因组RNA为模板,采用RT-PCR方法扩增得到全长为1623 bp编码NV主要衣壳蛋白VP1的ORF2全基因序列。将测序结果进行进化分析,结果表明该病毒属于NV GII。将ORF2亚克隆到原核表达载体pET-28a构建原核表达载体,鉴定后转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞。经IPTG诱导表达,获得大小约62 kD的融合蛋白并命名为rVP1。以纯化的rVP1免疫新西兰大白兔后制备高免血清,Western Blot结果表明,实验所获得的多克隆抗体可以特异性识别临床样本中NV VP1。因此,rVP1具有良好的免疫原性和反应原性。对小于rVP1的蛋白条带进行Western Blot分析,结果表明所有条带均为rVP1的部分蛋白。双向琼脂扩散试验结果显示实验所获得的高效价多克隆抗体与纯化的原核表达产物仅形成单一沉淀带。

关键词: 诺瓦克病毒, VP1, 原核表达, 产物分析

Expression of the ORF2 of Norovirus in *Escherichia coli* and the Product Analysis

WANG Da-Peng^{1,2,3} WU Qing-Ping^{2*} YAO Lin^{1,2,3} KOU Xiao-Xia² ZHANG Ju-Mei²

(1. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

(2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070)

(3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: Norovirus (NV) was one of new borne viruses, which was found firstly in the USA in 1972 and not reported in China until 1995. The main food-borne viral pathogens affect people badly and cause the epidemic acute gastroenteritis in all age groups worldwide. In this study, the genomic RNA was extracted from the non-bacterial gastroenteritis samples. A 1623 bp fragment, containing the complete coding sequence of the ORF2 gene, was amplified from the NV samples by RT-PCR. Sequencing analysis showed that it belongs to GII and shared more than 99% homology with the corresponding sequences published in the GenBank(DQ419908 and DQ369797). The ORF2 gene was then in-frame fused to the prokaryotic expression vector pET-28a, and the resultant recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30770077); 广东省自然科学基金(No. 07117275)

* 通讯作者: Tel/Fax: 020-87688132; ✉: wuqp@gdas.ac.cn

收稿日期: 2007-11-07; 接受日期: 2008-01-03

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

(DE3) competent cells. A 62 kD fusion protein, named rVP1, was expressed after IPTG induction. Rabbits were immunized by the purified rVP1. Western Blot results showed that the high titer antibody can specifically recognize the VP1 in the clinical samples from hospital. The data suggested that the rVP1 has good immunogenicity and reactionogenicity. The minor protein in the expression product was analyzed by Western Blot and double immunodiffusion test. The data showed that the minor proteins were the fragments of rVP1.

Keywords: Norovirus, VP1, Prokaryotic expression, Expression product analysis

诺瓦克病毒(Norovirus, NV)又称类诺瓦克病毒(Norwalk-like virus)或小圆结构病毒(Small round structured virus), 属于嵌杯状病毒科的诺瓦克病毒属^[1], 直径约 27 nm, 无囊膜, 1972 年由Kapikian等首次用免疫电镜的方法发现。该病毒是导致人类急性病毒性腹泻的主要病因, 被WHO定为B类病原。NV一般通过粪口途径传播或经污染的食品和饮用水感染, 特点是发病率高、致病剂量低和对外界的抵抗力较强^[2,3]。据欧美统计, 20 世纪 90 年代末食源性病毒性腹泻至少有 85%与NV有关^[4,5]。1995 年, 国内方肇寅等^[6]首次报道因该病毒引起的小儿急性腹泻。目前因没有敏感细胞系和合适的动物模型用于NV体外增殖^[7], 严重阻碍了其研究进展。因此, 体外表达NV结构蛋白VP1^[8,9]就成为研究该病毒的重要途径。Jiang X等^[10]获得的杆状病毒表达产物可以自动组装成病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs), 并以VLPs制备多克隆抗体; 国内, 郭丽等^[11]进行了ORF2 的真核表达。Tan M等研究发现原核表达ORF2 具有与真核表达同样的抗原性和受体吸附的特异性, 且表达产物不能自动组装成VLPs^[12], 但文章并没有对表达产物组分进行分析。所以, 本研究以临床腹泻样本为材料原核表达NV VP1 并进行表达产物分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料、菌株和质粒: 疑似诺瓦克病毒感染的非细菌性临床腹泻样本由广州医学院附属市妇婴医院检验科提供; 大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*) DH5 α 菌株和 BL21 (DE3) 菌株及 pET-28a 原核表达载体, 均由本室保存。

1.1.2 试验动物: 2 只体重 1 kg 左右的雄性新西兰大白兔和 2 只 8 周龄雌性 Balb/C 小鼠购自中山医科大学试验动物中心。

1.1.3 酶及主要试剂: 实验所需各种限制性内切

酶、RNA 逆转录试剂盒、Taq DNA 聚合酶和 pTZ57R/T 载体等, 均购自晶美生物工程有限公司; Trizol RNA 基因组提取试剂、Ni-NTA His-Bind Resin、Sigma 弗氏完全佐剂与不完全佐剂、HRP 标记的羊抗兔和抗鼠 IgG 等购自广东环凯微生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 ORF2 基因的引物设计: 参考GenBank公布 NV VP1 编码保守区序列, 自行设计一对特异性引物, 由北京赛百盛基因技术有限公司合成。Pf: 5'-GAATTCATGAAGATGGCGACGAATGACG-3'; Pr: 5'-GCGGCCGCTTATAATGCACGTCTACGC-3'。其中, 引物Pf和Pr所带下划线序列分别表示 *EcoR* 和 *Not* 酶切位点。

1.2.2 ORF2 基因的扩增 RT-PCR 扩增: 参考文献[13]检测非细菌性腹泻样本, 并以阳性样本作为实验材料。样本 RNA 提取方法按照 Trizol RNA 基因组提取试剂说明书进行, 并稍做修改(保存提取基因组 RNA 时水相与油相间残余的蛋白质)。

逆转录体系 20.0 μ L, 包括 6.0 μ L RNA, 1.5 μ L 0.5 μ g/ μ L oligo (dT)₁₈, 4.0 μ L DEPC ddH₂O, 4.0 μ L 5 \times Buffer, 2.5 μ L 10 mmol/L dNTPs, 1.0 μ L 20 U/ μ L RNA抑制酶, 1.0 μ L 200 U/ μ L M-MLV; 逆转录反应参数为 42 $^{\circ}$ C 60 min, 70 $^{\circ}$ C 10 min。

PCR反应体系 50.0 μ L, 包括 5.0 μ L上述反转录产物, 4.0 μ L 25 mmol/L MgCl₂, 2.0 μ L Taq E (1 U/ μ L), 5.0 μ L 10 \times Taq E Buffer (without Mg²⁺), 2.0 μ L 2 mmol/L dNTPs, Pf 和 Pr 各 1.0 μ L (10 μ mol/L), ddH₂O 30.0 μ L; PCR反应参数: 94 $^{\circ}$ C 变性 2 min后, 进入 35 个循环(94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2.0 min), 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 min。另外, 以无菌水代替逆转录产物作阴性对照。0.8%琼脂糖凝胶分析 RT-PCR 产物。

1.2.3 ORF2 基因的克隆、序列测定及序列分析: 按照 DNA 凝胶回收试剂盒操作说明书回收 ORF2

扩增产物并连接到 pTZ57R/T 载体, 构建质粒 pTZ57R-ORF2 转化 DH5 α 感受态细胞后进行蓝白斑筛选, 挑选白斑鉴定并进行测序(测序由上海英骏生物技术有限公司完成)。测序结果利用 MEGA3.1 软件对 GenBank 所公布的中国、欧洲、美国、日本等序列进行同源性分析。在线分析(<http://www.expasy.org/tools/>)编码蛋白质理化性质。

1.2.4 原核表达载体的构建与诱导表达: 利用引物含有的 *EcoR* 和 *Not* 将 ORF2 亚克隆到原核表达载体 pET-28a, 构建原核表达质粒 pET-ORF2。将鉴定正确的 pET-ORF2 和空载体 pET-28a 分别转化 BL21 (DE3) 感受态细胞。

参考 Novagen pET 操作手册进行 ORF2 的原核表达与鉴定。以终浓度为 0.05 mmol/L、0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L、1.0 mmol/L 和 1.2 mmol/L 的异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)分别诱导 2 h、3 h、4 h、5 h 和 6 h, 取样后按照上述方法进行蛋白质电泳确定最佳 IPTG 诱导浓度和诱导时间。

1.2.5 表达产物的纯化、兔和鼠高免血清的制备 按步骤 1.2.4 所确定的最佳参数培养含有 pET-ORF2 的 BL21 (DE3), 按照 Ni-NTA His-Bind Resin 中操作说明纯化重组蛋白。

取 0.40 mg 上述纯化蛋白作为抗原, 与等体积混合 Sigma 弗氏完全佐剂乳化后背部皮下多点注射免疫 2 只雄性新西兰大白兔; 其后每隔 3 周以每只 0.20 mg 融合蛋白与 Sigma 弗氏不完全佐剂乳化后加强免疫 3 次, 心脏采血分离血清。期间以纯化蛋白为抗原, 进行双向琼脂扩散试验测定血清效价。另外, 首免前以耳静脉取血并分离血清作为阴性血清。

上述纯化蛋白 SDS-PAGE 电泳后将 62 kD 蛋白切下研磨后, 皮下注射 2 只 8 周龄雌性 Balb/C 小鼠; 2 周后做 1 次加强免疫, 二免 10 d 后眼眶采血。首免前尾部采血并分离血清作为阴性血清。

1.2.6 Western Blot 检测: 按文献[14]的方法进行 Western Blot 检测。一抗为步骤 1.2.5 制备的兔高免血清; 二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG。其中, 以步骤 1.2.2 所保存的提取基因组 RNA 时水相与油相间的变性蛋白质为阳性对照; 以未进行 IPTG 诱导的含有质粒 pET-ORF2 的 BL21(DE3)为阴性对照。另外, 步骤 1.2.5 首免前制备的血清为阴性血清对照,

操作步骤同上。

以步骤 1.2.5 制备的 Balb/C 小鼠多抗为一抗, 二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 按照上述方法进行 Western Blot 检测。阴性对照同上。

2 结果与分析

2.1 ORF2 基因克隆、序列测定及其编码蛋白软件分析

利用优化的 RT-PCR 程序扩增出目的基因片段(图 1), 构建重组质粒 pTZ57R-ORF2 并测序, 获得 GenBank 登录号为 EF535854。序列分析比较结果表明, 该序列为 1623 bp 包含 ORF2 全基因编码序列, 共编码 541 个氨基酸。

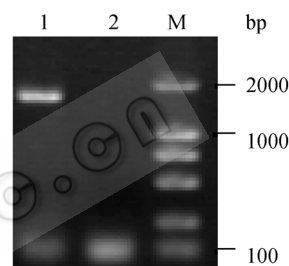


图 1 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 1 Analysis the RT-PCR production of ORF2

1: RT-PCR 产物; 2: 阴性对照; M: DL2000

1: RT-PCR product of ORF2; 2: Negative control; M: DL2000 Marker

利用进化分析软件 MEGA3.1 绘制所克隆基因进化树, 结果表明该毒株属于 G, 与北京株 DQ419908 和广州株 DQ369797 同源性最高, 达 99% 以上; 同时与英国株 AY581254, 爱尔兰株 DQ415279 以及德国株 AY485642 等同源性也较高(图 2)。ExpASy 在线分析蛋白特性数据表明, 该融合蛋白大小约为 62 kD, 在线分析结果表明该蛋白稳定性较差。

2.2 ORF2 基因的原核表达、多克隆抗体效价测定

诱导转化子表达检测结果显示, 在约 62 kD 处有一条明显区别于对照的蛋白表达条带并命名为 rVP1(图 3, 泳道 2); His-NTA His-Bind Resin 纯化产物含有小于 rVP1 的条带, 以约 27 kD 处最为明显(图 3, 泳道 3)。IPTG 最佳诱导浓度为 0.4 mmol/L, 最佳诱导时间为 4 h。另外, rVP1 以可溶性蛋白和包涵体两种形式存在, 但以包涵体形式为主。临床样

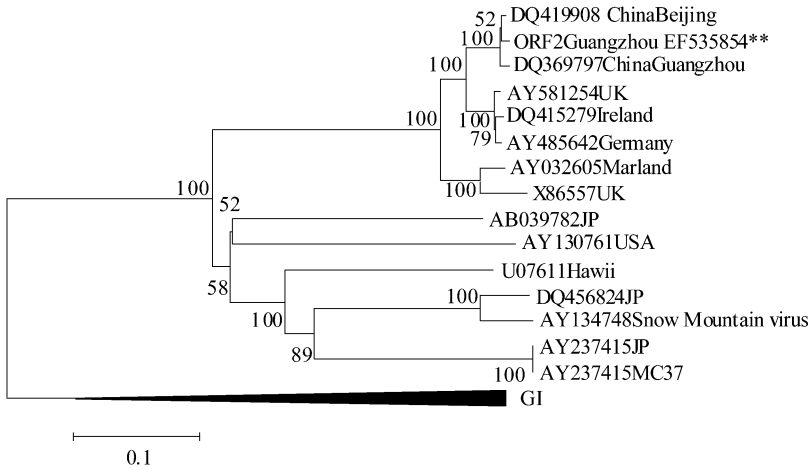


图 2 NV 各毒株 ORF2 核酸序列系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic trees of the nucleic acid sequences of OFR2 of Noroviruses

注: **为本研究扩增序列

Note: The sequence studied in this paper was marked with “**”

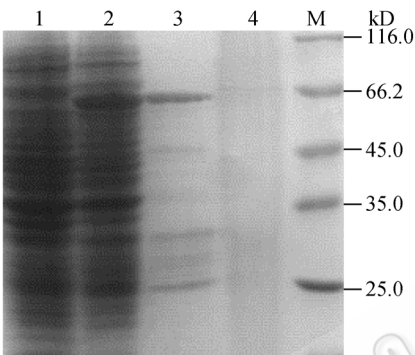


图 3 重组蛋白 rVP1SDS-PAGE 电泳分析图

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed fusion protein rVP1

1: 未诱导重组菌; 2: 诱导重组菌; 3: His-NTA His-Bind Resin 纯化 rVP1; 4: 临床腹泻样本; M: 蛋白质 Marker SM0431

1: Strain BL21(DE3)containing pET-ORF2 without induction by IPTG; 2: Strain BL21(DE3)containing pET-ORF2 with induction by IPTG; 3: rVP1 purified by His-NTA His-Bind Resin; 4: The protein in the gastroenteritis samples; M: Protein molecular mass marker SM0431

本也含有一条与 rVP1 大小相似的主蛋白条带并带有拖尾。

利用双向琼脂扩散试验检测融合蛋白免疫新西兰大白兔多克隆抗体效价结果为 2^4 , 且沉淀线仅有一条(图 4)。

2.3 Western Blot 检测分析

Western Blot 检测结果(见图 5, A)显示, 临床样本和原核表达产物在约 62 kD 处均出现明显的反应带; 在纯化原核表达产物的泳道 1 中, 62 kD 下方有一系列的显色条带; 利用切胶蛋白为抗原制备的血清得到与 rVP1 免疫血清同样的结果(见图 5, 第 1、

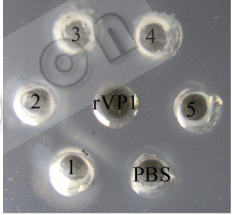


图 4 双向琼脂扩散试验

Fig. 4 Double immunodiffusion test

1-5: 倍比稀释兔高免血清; rVP1: Ag; PBS: 阴性对照

1-5: Serial dilution of the rabbit antiserum; rVP1: Antigen; PBS: Negative control

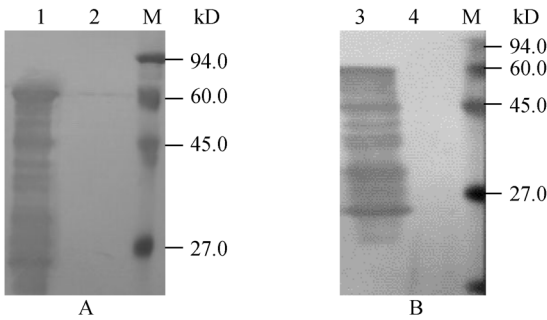


图 5 rVP1 纯化蛋白 Western Blot 分析

Fig. 5 The analysis of small protein rVP1 by Western Blot

A: 一抗为纯化 rVP1 免疫兔血清; B: 一抗为 rVP1 切胶免疫鼠血清

1,3: 纯化 rVP1; 2: 临床样本; 4: 诱导 pET-28a 转化子; M: 预染蛋白质 Marker MP204

A: The first antibody was from rabbit immunized by purified rVP1; B: The first antibody was from Balb/C mice immunized by rVP1 cut from the SDS-PAGE gel

1,3: Purified rVP1; 2: The gastroenteritis samples; 4: Strain BL21(DE3) containing pET-28a with induction by IPTG; M: Prestained protein molecular weight marker MP204

3 泳道)。空载体诱导和兔阴性血清为一抗的 rVP1 无任何反应条带。另外,临床样本泳道在 62 kD 处有特异性条带,图 3 中临床样本的拖尾没有任何反应。以切胶蛋白为抗原制备的鼠多抗为一抗进行的 Western Blot 检测结果表明,小于 62 kD 的蛋白条带与 rVP1 同源(见图 5, B)。

3 讨论

本研究根据GenBank已公布的NV衣壳蛋白VP1 编码保守区序列,自行设计一对针对该病毒ORF2 编码区的特异性引物,运用RT-PCR方法成功扩增获得了G 型NV主要衣壳蛋白VP1 编码基因ORF2。测序结果分析表明,该RT-PCR产物中含有完整的 ORF2 基因编码序列,获得GenBank登录号为 EF535854。与GenBank报道国内的北京株DQ419908 和广州株DQ369797 同源性达 99%以上,说明国内所报道的NV属于同一族毒株。虽然因NV不同毒株间变异较大导致免疫学检测方法的应用受到制约^[15],但是对于国内NV绝大多数属于GII族来说^[16,17],免疫学检测方法还是有一定应用意义。另外,进化分析结果表明,中国毒株与欧洲株亲源性较高。

本研究运用原核表达系统成功表达了完整的 ORF2 基因,SDS-PAGE电泳结果显示融合蛋白rVP1 大小约 62 kD,与临床样本中主蛋白条带相近。Western Blot结果中, Ni-NTA His-Bind Resin纯化泳道中从目的蛋白处到 27 kD处显色条带,与Tan M等^[12]研究结果相似。但是Tan M等^[12]并没有对小于重组蛋白的蛋白条带进行分析。本研究结果显示小于 62 kD的蛋白条带可与切胶免疫的血清发生反应,而且双向琼脂扩散实验中仅有单一的沉淀线,我们推测Ni-NTA His-Bind Resin纯化后rVP1 泳道中的小蛋白条带是rVP1 部分片段。rVP1 所带有的载体融合蛋白(含有His tag)位于其N端,而其C端为裸露蛋白。故本研究中利用Ni-NTA His-Bind Resin纯化的蛋白为rVP1 和其C端降解的部分蛋白^[14]的混合物。Tan M等也有类似的推测^[12]。27 kD处显色条带蛋白大小与NV在机体内被蛋白酶水解^[18,19] (227 aa)的N端蛋白大小相似,可见VP1 的稳定性较差,与ExPASy在线分析蛋白结果一致。

临床样本中 VP1 条带较弱,我们推测这与患者

多次腹泻后导致样本中病毒含量降低有关;泳道中所出现的拖尾现象可能为食糜中的杂蛋白、肠道新陈代谢脱落的组织蛋白及少量肠道常在菌导致。但是实验结果中,所制备的多克隆抗体仅识别临床样本中的主蛋白条带;与拖尾蛋白没有任何反应。显示出本研究制备的高免血清具有较高的特异性,为NV 免疫学方法的建立提供了理论支持。另外,Western Blot 中以腹泻样本作为检测对象并且有特异性反应条带,从另外一个角度证明本研究获得的表达产物及多克隆抗体是正确的。

原核表达产物同样具有真核表达产物的抗原性和受体吸附特异性^[12]。所以, rVP1 虽然不能自动组装成VLPs,但是可以展示VP1 抗原表位^[12]。另外,VP1 N端蛋白保守性很高且不同毒株有交叉反应^[20],而且研究表明N端抗原决定簇要比C端多^[21]。所以,利用线性表达产物制备VP1 的抗体对于研究NV衣壳蛋白是很有必要的。目前,制备VP1 抗体通常以纯化的VLPs或NV为抗原,而本研究首次以原核表达产物rVP1 作为抗原获得特异性好的高效价兔多克隆抗体。Western Blot实验过程中作为一抗的兔高免血清工作浓度为 1 万倍稀释,但是原血清在 50 万倍稀释的浓度下仍然可以与临床腹泻样本和rVP1 发生特异性反应,可见该表达产物具有很强的免疫原性;其中,以rVP1 免疫新西兰大白兔获得高免血清仅特异性的识别临床腹泻样本中NV衣壳蛋白,可见该高免血清也具有较好的特异性。所以, rVP1 具有良好的免疫原性和反应原性。因NV至今仍未有体外增殖模式, NV临床腹泻阳性样本和阳性血清较难得,故rVP1 体外表达产物的获得为我们深入研究NV衣壳蛋白特性、单克隆抗体的制备及检测方法的建立奠定了基础。

致谢: 感谢广州医学院附属市妇婴医院检验科丘仙桃医生提供的临床非细菌性腹泻样本。

参考文献

- [1] Green J, Vinje J, Gallimore CI, *et al.* Capsid protein diversity among Norwalk-like viruses. *Virus Genes*, 2000, **20**(3): 227-236.
- [2] Otsu R, Ishikawa A, Mukae K, *et al.* Molecular epidemiology of norwalk-like virus (NLV) outbreaks occurring in Kyushu Japan between 1988 and 1993. *Eur J Epidemiol*, 2003, **18**(4): 369-372.

- [3] Straub TM, Höner zu Bentrup K, Orosz-Coghlan P, *et al.* *In vitro* cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg Infect Dis*, 2007, **13**(3): 396–403.
- [4] Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, *et al.* Epidemiologic and molecular trends of Norwalk-like viruses associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis*, 2002, **186**(1): 1–7.
- [5] Lopman BA, Reacher MH, Van Duynhoven Y, *et al.* Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995–2000. *Emerg Infect Dis*, 2003, **9**(1): 90–96.
- [6] 方肇寅, 温乐英, 晋圣瑾, 等. 在我国腹泻患儿中发现诺瓦克样病毒感染. *病毒学报*, 1995, **11**(3): 215–219.
- [7] Sharp TW, Hyams KC, Watts D, *et al.* Epidemiology of Norwalk virus during an outbreak of acute gastroenteritis aboard a US aircraft carrier. *J Virol Methods*, 1995, **45**(1): 61–67.
- [8] Jiang X, Wang M, Wang K, *et al.* Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology*, 1993, **195**(1): 51–61.
- [9] Hardy ME. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, **253**(1): 1–8.
- [10] Jiang X, Wang M, Graham DY, *et al.* Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol*, 1992, **66**(11): 6527–6532.
- [11] 郭 丽, 周红莉, 屈建国, 等. 人诺如病毒衣壳蛋白的密码子优化及在昆虫细胞中的表达. *中国病毒学*, 2006, **21**(2): 121–125.
- [12] Tan M, Zhong WM, Song D, *et al.* *E.coli*-expressed recombinant Norovirus capsid proteins maintain authentic antigenicity and receptor binding capability. *J Med Virol*, 2004, **74**(4): 641–649.
- [13] Jiang X, Huang PW, Zhong WM, *et al.* Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods*, 1999, **83** (1-2): 145–154.
- [14] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [15] Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev*, 2001, **14**(1): 15–37.
- [16] 吕红霞, 方肇寅, 谢华屏, 等. 河北省卢龙县 1999~2001 年婴幼儿杯状病毒腹泻流行病学研究. *中华流行病学杂志*, 2003, **24**(12): 1118–1121.
- [17] 谢华屏, 方肇寅, 王 光, 等. 长春市儿童医院 1998~2001 年婴幼儿杯状病毒腹泻流行病学研究. *病毒学报*, 2002, **18**(4): 332–336.
- [18] Hardy ME, White LJ, Ball JM, *et al.* Specific proteolytic cleavage of recombinant Norwalk Virus capsid protein. *J virol*, 1995, **69**(3): 1693–1698.
- [19] Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, *et al.* X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*, 1999, **286**(5438): 287–290.
- [20] Hansman GS, Natori K, Shirato-Horikoshi H, *et al.* Genetic and antigenic diversity among norovirus. *J Gen Virol*, 2006, **87**(Pt 4): 909–919.
- [21] Yoda T, Terano Y, Suzuki Y, *et al.* Characterization of Norwalk virus GI specific monoclonal antibodies generated against *Escherichia coli* expressed capsid protein and the reactivity of two broadly reactive monoclonal antibodies generated against GII capsid towards GI recombinant fragments. *BMC Microbiol*, 2001, **1**: 24.

新辟栏目介绍

生物实验室

将原来“技术与方法”栏目改为“生物实验室”。刊发的文章主要侧重于从实验室科研人员的角度, 深度报道使用某种仪器设备进行实验后所获得的最新结果, 交流由此衍生出的新技术新方法。希望此栏目能够成为架起实验室与实验室, 以及实验室与仪器生产商之间联系的桥梁。