

研究报告

广州地区 GII.4 Sydney 2012[P31]型诺如病毒 GZ2013-L10 毒株病毒样颗粒功能和免疫原性鉴定

王林平^{#1,2}, 高珺珊^{#2}, 薛亮^{*2}, 梁燕惠², 洪晓静², 张菊梅², 任羽¹, 吴清平^{*2}

1 喀什大学生命与地理科学学院 新疆帕米尔高原生物资源与生态重点实验室, 新疆 喀什 844000

2 广东省科学院微生物研究所 广东省科学院 华南应用微生物国家重点实验室 广东省微生物安全与健康重点实验室 农业农村部农业微生物组学与精准应用重点实验室, 广东 广州 510070

王林平, 高珺珊, 薛亮, 梁燕惠, 洪晓静, 张菊梅, 任羽, 吴清平. 广州地区 GII.4 Sydney 2012[P31]型诺如病毒 GZ2013-L10 毒株病毒样颗粒功能和免疫原性鉴定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2256-2265

Wang Linping, Gao Junshan, Xue Liang, Liang Yanhui, Hong Xiaojing, Zhang Jumei, Ren Yu, Wu Qingping. Identification of the function and immunogenicity of virus-like particles of GII.4 Sydney 2012[P31] norovirus GZ2013-L10 strain in Guangzhou[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2256-2265

摘要:【背景】诺如病毒(Norovirus, NoV)是全球范围内引起急性胃肠炎暴发的主要病原体之一, 其中 GII.4 型通过不断变异在人群中持续存在并占据诺如病毒感染的主导地位, 尤其 GII.4 Sydney 2012[P31]变异株自 2012 年出现以来在全球各地持续流行至今。【目的】制备广州地区 GII.4 Sydney 2012[P31]型诺如病毒毒株 GZ2013-L10 的病毒样颗粒(virus like particle, VLP), 并系统表征其功能及免疫原性特点。【方法】从毒株 GZ2013-L10 中扩增 ORF2 基因并克隆构建重组转座载体 PFastBac1-L10-ORF2, 进一步转化至大肠杆菌 DH10Bac 构建重组杆状病毒质粒, 进而在昆虫细胞 sf9 中表达病毒样颗粒并通过超速离心纯化, 最后经透射电镜、Western blotting 和受体结合实验对病毒样颗粒进行表征。此外, 将免疫小鼠获得的病毒抗血清通过间接酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和受体结合阻断试验进行验证。【结果】成功构建了重组杆状病毒质粒 Bacmid-L10-ORF2 并获得病毒样颗粒, 电镜结果表明病毒样颗粒直径约为 30 nm, SDS-PAGE 和 Western blotting 显示蛋白大小约为 58 kDa。受体结合实验结果显示, 病毒样颗粒能与 A/B/O 等分泌型唾液受体及猪胃黏膜蛋白结合, 而非分泌型唾液受体均不结合; 免疫小鼠获

基金项目: 国家自然科学基金(31872912); 广东省自然科学基金杰出青年基金(2019B151502065); 广东省重点研发计划(2019B020209001)

#对本文贡献相同

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31872912); Natural Science Foundation of Guangdong Province for Distinguished Young Scholars (2019B151502065); Key Research and Development Program of Guangdong Province (2019B020209001)

#These authors equally contributed to this work

***Corresponding authors:** E-mail: XUE Liang: xueliang@gdim.cn; WU Qingping: wuqp203@163.com**Received:** 2021-09-28; **Accepted:** 2021-12-27; **Published online:** 2022-01-29

得效价为 1.3×10^5 的抗血清, 但 ELISA 结果显示其与不同基因型诺如病毒衣壳蛋白无交叉免疫活性。此外, 抗血清对同型病毒样颗粒具有受体中和阻断作用, 但对不同型别病毒样颗粒(包括 GII.8、GII.17 和 GII.3)无中和效果。【结论】本研究制备并系统表征了广州地区 GZ2013-L10 毒株的病毒样颗粒及其抗血清, 其研究结果可为解析其流行原因以及疫苗研发提供参考。

关键词: 诺如病毒; 病毒样颗粒; 功能鉴定; 免疫原性; 抗血清

Identification of the function and immunogenicity of virus-like particles of GII.4 Sydney 2012[P31] norovirus GZ2013-L10 strain in Guangzhou

WANG Linping^{#1,2}, GAO Junshan^{#2}, XUE Liang^{*2}, LIANG Yanhui², HONG Xiaojing², ZHANG Jumei², REN Yu¹, WU Qingping^{*2}

1 Kashi University, Key Laboratory of Biological Resources and Ecology of Pamirs Plateau in Xinjiang Uygur Autonomous Region, College of Life and Geographic Sciences, Kashi 844000, Xinjiang, China

2 Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Key Laboratory of Agricultural Microbiomics and Precision Application, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510070, Guangdong, China

Abstract: [Background] Norovirus (NoV) is one of the main causes of global acute gastroenteritis. Among the viruses, GII.4 genotype persists through continuous mutation and is responsible for the majority of NoV infections. Particularly, since the emergence in 2012, GII.4 Sydney 2012[P31] variant has been prevalent all over the world. [Objective] To prepare virus-like particle (VLP) of GII.4 Sydney 2012[P31] NoV strain GZ2013-L10 in Guangzhou and systematically characterize its function and immunogenicity. [Methods] The ORF2 gene of GZ2013-L10 was amplified and cloned to construct the recombinant transposon vector pFastBac1-L10-ORF2. The vector was further transformed into *Escherichia coli* DH10Bac to develop the recombinant baculovirus plasmid, which was then transfected into insect cells sf9 for the expression of VLPs. The yielded VLPs were purified by ultracentrifugation. Finally, transmission electron microscopy, Western blotting, and receptor binding experiment were performed to characterize the VLPs. In addition, indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and test of the blocking of receptor binding were carried out to verify the virus antiserum of the immunized mice. [Results] We successfully constructed the recombinant baculovirus plasmid Bacmid-L10-ORF2 and obtained VLPs. Electron microscopy demonstrated that the VLPs were about 30 nm in diameter. SDS-PAGE and Western blotting showed that the proteins were 58 kDa. Salivary receptor experiment results showed that the VLPs of GZ2013-L10 can bind to secretory salivary receptors such as A/B/O and porcine gastric mucosa protein (PGM) rather than non-secretory salivary receptors. Antiserum with a titer of 1.3×10^5 was detected in the immunized mice. However, ELISA results showed no cross-immunoreactivity with capsid proteins of different NoV genotypes. In addition, the antiserum blocked the receptor binding of VLP of the same genotype but had no neutralizing effect on VLP of a

different genotype (such as GII.8, GII.17, and GII.3). **[Conclusion]** VLP of GZ2013-L10 in Guangzhou and its antiserum were prepared and systematically characterized. The result can serve as a reference for elucidating the cause of the epidemic and developing vaccines.

Keywords: Norovirus; virus-like particles; functional identification; immunogenicity; antiserum

诺如病毒(Norovirus, NoV)是全球范围内引起成人和儿童非细菌性急性胃肠炎暴发流行的重要病原体,其引起的急性胃肠炎约占全球腹泻病例的 1/5,导致每年约 20 万人死亡,造成严重的经济和社会负担^[1-2]。NoV 为杯状病毒科诺如病毒属^[3],是线性单链无包膜的 RNA 病毒,基因组全长为 7.5–7.8 kb,包括 3 个开放性阅读框(open reading frame, ORF),ORF1 编码病毒复制所需的 6 种非结构蛋白,ORF2 编码主要衣壳蛋白(VP1),ORF3 编码次衣壳蛋白(VP2)^[4]。其中 VP1 被进一步分为内部壳结构域(S)和突出结构域(P),后者能识别宿主组织血型抗原受体(histo-blood group antigen receptor, HBGA),是构成免疫原性的关键区域^[5]。VP1 于体外真核系统能自发形成在形态大小和抗原性等方面均与天然病毒颗粒很相似的病毒样颗粒(virus like particle, VLP),因此在缺乏成熟的体外培养体系下被作为 NoV 疫苗研发和机制研究方面的良好替代品。

NoV 具有丰富的遗传多样性,根据 VP1 氨基酸序列将其分为 10 个基因群(GI–GX),超过 40 种基因型^[6]。其中 GI 和 GII 是主要感染人的基因群,尤其以 GII 基因群引起了全球 75%–100%的 NoV 感染病例,而 GII.4 又是 GII 型中的优势基因型,在过去 20 余年里一直在全球范围内 NoV 感染暴发事件中占据主导地位,并且每隔 2–3 年的时间又会出现新的变异流行株^[7-8]。GII.4 Sydney 2012[P31]变异株自 2012 年出现以来,其检出率在全球范围内大幅度上升,并逐渐成为优势流行株和引起严重卫生事件的

主要病原体^[9-11]。虽然在 2014–2015 年冬季新 GII.17 Kawasaki 2014 流行株出现并短暂流行^[12],但并未完全取代 GII.4 的地位,目前 GII.4 Sydney 2012[P31]流行株仍然在流行。我们团队对广州地区的长期监测数据显示, GII.4 Sydney 2012[P31]重新成为造成 NoV 流行的主要变异株^[13]。因此,在前期工作基础上,本研究以广州地区急性腹泻患者分离的 GII.4 Sydney 2012[P31]型 NoV 毒株 GZ2013-L10 为对象,制备并系统表征 VLP 的功能和免疫原性特征。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本

GZ2013-L10 毒株为本团队前期在广州地区急性腹泻患者中分离^[14];唾液样本由本实验保存;草地夜蛾细胞(sf9),国家细胞资源平台;大肠杆菌 DH10Bac 和 DH5 α 感受态细胞分别购自北京庄盟生物和 TaKaRa 公司。

1.1.2 工具酶、载体和试剂

pFastBac1 转座载体由本实验室保存,限制性内切酶 *Bam*H I、*Sph* I 及 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase、PMD19-T, TaKaRa 公司;杆状病毒穿梭载体 Bacmid 质粒提取试剂盒、Western blotting 快速封闭液,北京碧云天生物公司;无血清培养基 SIM SF、昆虫细胞转染试剂 Sinofection,北京义翘神州公司;凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒,美基公司;IPTG、X-gal、四环素、庆大霉素、卡那霉素,生工生物工程(上海)股份有限公司;BCA 蛋白定量试

剂盒, 广州真知生物科技有限公司; 脱脂奶粉, 武汉博士德生物有限公司; 辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 标记的 Goat Anti Mouse IgG (H+L), 北京博奥森生物技术有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 引物设计和目的片段扩增

根据毒株 GZ2013-L10 的 ORF2 基因序列设计上、下游引物, GZ2013-L10-F: 5'-CGGGATCC ATGAAGATGGCGTCGAGT-3' (划线部分为 *Bam*HI 酶切位点); GZ2013-L10-R: 5'-CATGC ATGCTTACACCCGTGACTCCCC-3' (划线部分为 *Sph*I 酶切位点)。以病毒基因组为模板 PCR 扩增 ORF2 基因。PCR 反应体系 (50 μ L): 模板 1 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 高保真酶 Mix 预混液 25 μ L, ddH₂O 22 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。

1.3 杆状病毒表达载体的构建

利用限制性内切酶 (*Bam*HI 和 *Sph*I) 将扩增产物与转座载体 pFastBac1 进行双酶切, 连接后转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞得到 pFastBac1-L10-ORF2 重组转座载体。将构建成功的重组转座载体转化至大肠杆菌 DH10Bac, 涂布于含有 X-gal (100 μ g/mL) 和 IPTG (40 μ g/mL) 的抗性平板 (50 μ g/mL 卡那霉素、10 μ g/mL 四环素和 7 μ g/mL 庆大霉素) 上, 挑取白色的单菌落进行菌落 PCR 验证, 设定野生型杆状病毒组作为对照组, 将阳性克隆送至北京六合华大公司测序。

1.4 VLP 在昆虫细胞 sf9 中的表达及纯化

将 Bacmid-L10-ORF2 质粒转染昆虫细胞 sf9 获得重组杆状病毒, 收集上清为 P1 代病毒, 将 P1 代的杆状病毒在 80% 左右单层细胞量的 sf9 细胞内进一步增殖, 收集上清为 P2 代病毒, 按照 2×10^6 个/mL 的细胞密度在 27 $^{\circ}$ C、150 r/min

条件下表达, 待细胞出现 80% 以上的细胞病变后, 收集细胞及培养上清于 4 $^{\circ}$ C、7 000 \times g 离心 10 min, 收集上清。沉淀用 PBS 重悬超声 (功率 35 W, 工作时间 5 min、间歇时间 2 min, 全部时间 10 min) 破碎后离心 (7 000 \times g、10 min) 收集上清。将两次上清混合后用 7% (质量体积分数) 的 PEG6000 和 2% (质量体积分数) 的氯化钠溶液絮凝过夜, 然后在 4 $^{\circ}$ C、10 000 \times g 离心 30 min 收集沉淀, 用 PBS 重悬后与等体积氯化铯溶液 (1.4 g/mL) 混合, 在 8 $^{\circ}$ C、288 000 \times g 离心 24 h, 分层后采用侧穿的方式收集可见带, 用 PBS 重悬, 继续于 8 $^{\circ}$ C、141 000 \times g 离心 3 h 除去氯化铯, 收集超离心管底部的沉淀即为 VLP。

1.5 VLP 的鉴定

首先利用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 再用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶进行蛋白电泳验证。取 1 μ g/ μ L VLP 负染后, 在透射电镜下观察其形态大小及完整度。通过湿转仪将蛋白条带转印至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上 (300 mA, 90 min), 快速封闭液封闭 15 min, 用 GII.4 型 VLP 的抗血清 (1:10 000) 作为一抗于 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBST 漂洗 3 次, 每次 10 min, 再用羊抗鼠 (1:3 000) 作为二抗室温孵育 1 h, 洗涤完成后, 采用 ECL 化学发光法进行显影。利用间接 ELISA 方法对 VLP 进行抗原性验证: 取 100 μ L 的 1 μ g/mL VLP 于酶标板, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜, 用 5% (质量体积分数) 脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h, 加入梯度稀释的 GII.4 型 VLP 抗血清 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 再加入 HRP 标记的羊抗鼠 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 加入 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (tetramethyl benzidine, TMB) 显色液于 37 $^{\circ}$ C 显色, 最后加入 50 μ L 的 ELISA 终止液, 酶标仪测定 OD₄₅₀ 值, 以上每步结束均洗板 5 次。

1.6 VLP 抗血清的制备和表征

选择 5 只 7 周龄的雄性 Balb/c 小鼠, 取纯

化后 6 mg/mL 的 VLP 抗原(10 μ g)与等体积的弗氏完全佐剂混合后乳化至油包水状态,加强免疫为与首免相同剂量的抗原和等体积的弗氏不完全佐剂混合,共 3 次加强免疫,采用皮下多点注射方式,每次间隔 2 周,免疫完成后取血清利用间接 ELISA 方法进行效价测定。同时取抗血清与不同基因型 P 颗粒蛋白进行免疫交叉性实验^[15],取各基因型 P 蛋白包被,同间接 ELISA 方法,其中 GII.4 型 VLP 和 PBS 分别作为阳性与阴性对照。

1.7 VLP 与唾液 HBGA 受体的结合活性

取 1:1 000 稀释度唾液样本 100 μ L 于酶标板 4 $^{\circ}$ C 包被过夜,洗板 2 次后,加入 200 μ L 5% (质量体积分数)的脱脂奶粉于 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h;然后加入 100 μ L 浓度为 1 μ g/mL 的 VLP 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,一抗用 GII.4 型 VLP 的抗血清孵育 1 h,二抗用羊抗鼠抗体 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,以上每步结束均洗板 5 次;然后加入 TMB 显色液于 37 $^{\circ}$ C 显色,最后加入 50 μ L 的 ELISA 终止液,测定 OD_{450} 值。用猪胃黏膜蛋白(porcine gastric mucosa protein, PGM)包板作为阳性对照组。

1.8 HBGA 受体结合阻断实验

将 PGM 以浓度 1 mg/mL 加入 100 μ L 于酶标板 4 $^{\circ}$ C 过夜,洗板 2 次后用 5% (质量体积分数)的脱脂奶粉于 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h,同时将 GII.4 抗血清(从 1:100 以 2 倍倍比稀释 12 个梯度)与 1 μ g/mL 的 VLP 等体积(各 50 μ L)混合于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;然后加入到封闭完成的酶标板上于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,再加入 GII.4 鼠源抗血清(1:10 000)于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后,加入羊抗鼠(1:3 000)于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗板完成后加入 TMB 显色液于 37 $^{\circ}$ C 显色;最后加入 50 μ L 的终止液,测定 OD_{450} 值。以上每步结束均洗板

5 次,同时设定不加入抗血清的 VLP 和 PBS 作为对照组,计算抑制率。抑制率(%)=(未加抗血清的 VLP 吸光度值-加入抗血清孵育的样品孔吸光度值)/未加抗血清的 VLP 吸光度值。

2 结果与分析

2.1 重组杆状病毒质粒的构建与验证

PCR 产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳后,结果显示在 1 700 bp 左右有特异性条带(图 1A),与预期的大小相符。PCR 产物连接转化后经菌落 PCR 验证,结果显示在 1 700 bp 同样有明亮条带(图 1B),测序结果显示插入的目的片段完整无误,表明重组转座质粒(pFastBac1-L10-ORF2)构建成功。重组转座质粒转化至大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞,通过蓝白斑筛选和菌落 PCR 验证,在 4 000 bp (2 300 bp+1 700 bp)有特异性条带,而野生型杆状病毒的 PCR 产物大小在 300 bp 左右(图 1C)。取 5 μ L 重组杆状病毒质粒作为模板进行 PCR 验证,结果显示在 4 000 bp 有特异性条带(图 1D),表明重组杆状病毒质粒(Bacmid-L10-ORF2)构建成功。

2.2 VLP 的表达与鉴定

将重悬后的 VLP 经超速离心后可以观察到一条清晰的可见带,即为目的蛋白(图 2A);经测定蛋白浓度为 6 mg/mL,透射电镜结果显示颗粒完整,大小为 30 nm 左右(图 2B)。SDS-PAGE 和 Western blotting 结果显示,在 58 kDa 附近有特异性条带(图 2C、2D),与预计大小一致,而被野生型杆状病毒感染的 sf9 细胞和正常的 sf9 细胞都无特异性条带;间接 ELISA 结果显示 VLP 与抗血清结合(OD_{450} 为 1.748),而对照组 PBS 为阴性(图 2E),表明制备的 VLP 具有抗原性,可与抗血清特异性结合。

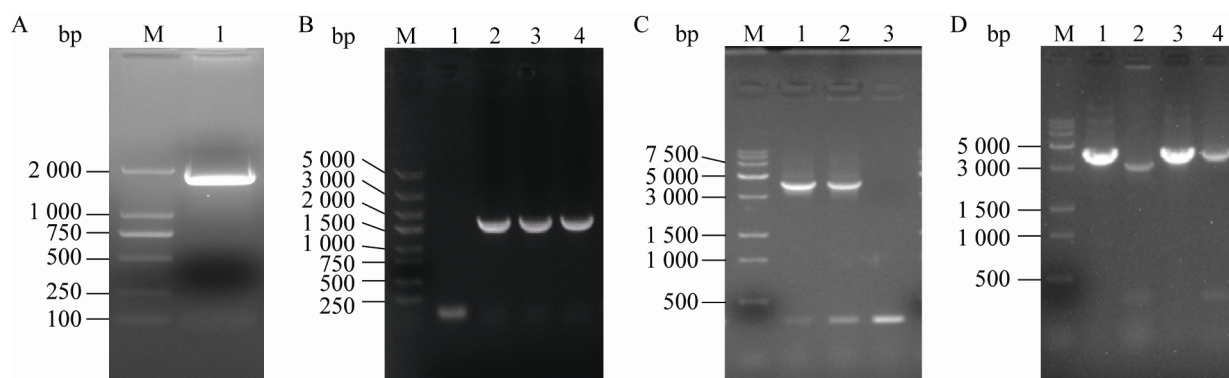


图 1 重组杆状病毒质粒 Bacmid-L10-ORF2 的构建和验证 A: L10-ORF2 基因的 PCR 扩增。B: 重组 pFastbac1-L10-ORF2 的菌落 PCR 验证(1: 阴性克隆; 2-4: 阳性克隆)。C: 重组 Bacmid-L10-ORF2 的菌落 PCR 验证(1、2: 阳性克隆; 3: 野生型杆状病毒-阴性对照)。D: 重组 Bacmid-L10-ORF2 质粒的 PCR 验证(1、3: 重组 Bacmid-L10-ORF2 的质粒作为模板; 2: ORF3; 4: 重组 Bacmid-L10-ORF2 的菌液作为模板)。M: DNA Marker

Figure 1 Construction and verification of recombinant baculovirus plasmid Bacmid-L10-ORF2. A: PCR amplification of L10-ORF2 gene. B: Verification of recombinant pFastbac1-L10-ORF2 by colony PCR (1: Negative clone; 2-4: Positive clone). C: Verification of recombinant Bacmid-L10-ORF2 by colony PCR (1, 2: Positive clone; 3: Wild-type baculovirus-negative control). D: Verification of recombinant Bacmid-L10-ORF2 plasmid by PCR (1, 3: Plasmid of recombinant Bacmid-L10-ORF2 as template; 2: ORF3; 4: Bacteria of recombinant Bacmid-L10-ORF2 as template). M: DNA Marker.

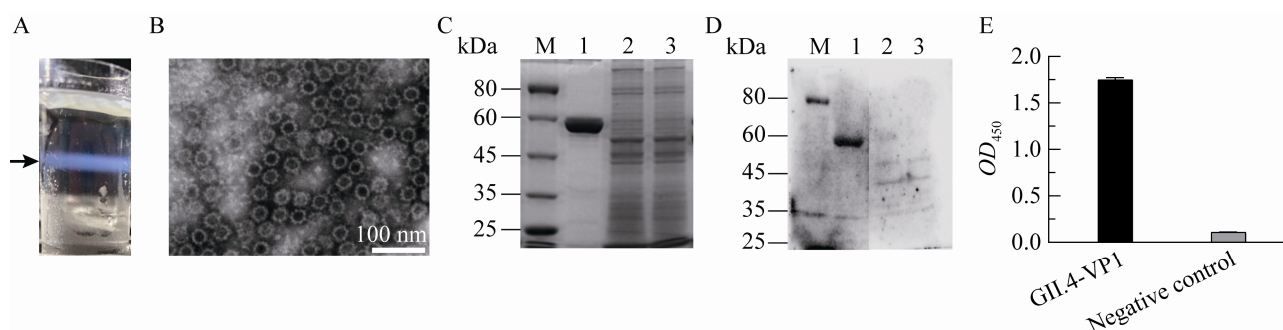


图 2 VLP 表达与鉴定 A: VLP 的超离纯化。B: VLP 的透射电镜结果。C: SDS-PAGE, M: 蛋白 Marker; 1: 纯化的 VLP; 2: 未被感染的正常 sf9 细胞; 3: 被野生型杆状病毒感染的 sf9 细胞。D: Western blotting, M: 蛋白 Marker; 1: 纯化的 VLP; 2: 未被感染的正常 sf9 细胞; 3: 被野生型杆状病毒感染的 sf9 细胞。E: 间接 ELISA (阴性对照: PBS)

Figure 2 Expression and identification of VLP. A: Purification of VLP by ultracentrifugation. B: TEM result of VLP. C: SDS-PAGE, M: Protein Marker; 1: Purified VLP; 2: Uninfected normal sf9 cells; 3: sf9 cells infected with wild-type baculovirus. D: Western blotting, M: Protein Marker; 1: Purified VLP; 2: Uninfected normal sf9 cells; 3: sf9 cells infected with wild-type baculovirus. E: Indirect ELISA (negative control: PBS).

2.5 GII.4 Sydney 2012[P31]型 NoV 毒株 GZ2013-L10 抗血清阻断实验

GZ2013-L10 抗血清的受体结合阻断实验结果显示, 其只对 GII.4 Sydney 2012VLP 具有受体中和阻断作用, 在抗血清稀释倍数小于 6 400 时其抑制率在 70%左右, 稀释倍数达到 12 800 后抑制率均低于 50%, 而对不同型的 VLP (GII.8、GII.3 和 GII.17)均不具备保护作用, 抑制率均低于 50% (图 5)。

3 讨论与结论

NoV 在全球范围内持续流行, 严重威胁着公共卫生和食品安全。GII.4 型在过去二十余年一直在 NoV 感染流行中占据主导地位, 并且每隔几年就会出现新的变异株^[16]。其中, GII.4 Sydney 2012[P31]流行株自 2012 年出现以来一直流行至今。据报道, 泰国在 2012 年的急性胃肠炎感染调查中, 从 889 份粪便标本中检测出 154 份 NoV 阳性, 其中 GII.4 基因型占比为 66.9%^[9]。然而在意大利, 702 份急性胃肠炎患者中检测出 162 份 NoV 阳性, 其中 GII.4 Sydney

2012[P31]仍是最主要的变异株^[10]。在我国, 自 2012–2013 年开始, GII.4 Sydney 2012[P31]流行株检出率大幅度升高^[11,17]。作者团队在广州地区的长期监测结果也显示, GII.4 型变异株在后 GII.17 时期仍在继续流行^[13]。因此, 本研究在前期工作基础上进一步制备了 GII.4 Sydney 2012[P31]毒株的 VLP 及其抗血清, 并对其功能和免疫原性特点进行了系统表征。

宿主受体结合功能是影响 NoV 流行的重要因素之一。不同基因型均呈现出受体结合能力, 包括非流行基因型 GII.3, 其与 A、B、AB、O 型分泌型 HBGA 受体及非分泌型 HBGA 受体都可以结合, 但结合能力均较弱^[18]。本实验结果显示, GZ2013-L10 毒株 VLP 可与分泌型(A、B、AB 和 O 型) HBGA 受体及 PGM 结合, 其中 B 型唾液受体与 VLP 结合的 OD_{450} 值最高, 但与非分泌型 HBGA 受体不结合。尽管 GII.4 型 NoV 自 20 世纪 70 年代至今已出现十余种变异株, 但仍较少出现关于结合非分泌型唾液受体的报道^[19]。需要注意的是, 唾液中血型受体的结合作用是 NoV 衣壳蛋白的体外功能, 并未完全表征宿主的易感性。然而仍有研究报道在非分泌 HBGA 受体的人群中发生了 NoV 感染^[20], 因此有学者仍在探索是否存在多个受体结合位点, 从而导致了 GII.4 Sydney 2012[P31]的长期流行^[21–22]。

衣壳蛋白 VP1 是 NoV 持续进化机制研究及疫苗研发的主要对象^[23]。目前在临床试验中的双价 VLP 疫苗(GI.1 和 GII.4)^[24]数据显示, GI.1-VP1 诱导 GI.1 型 NoV 所产生的抗体至少能够阻断几种不同的 GI 群变异株, 但 GII.4 不具有这种能力, 并且 GII.4 型疫苗注射后抗体滴度下降较快。目前报道的 NoV 感染人体后只有短期的保护周期(<6 个月)^[25]。本实验结果显示,

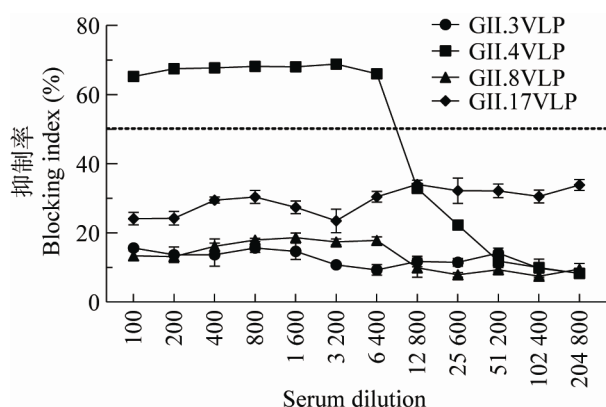


图 5 GZ2013-L10 毒株 VLP 抗血清的交叉阻断活性

Figure 5 The cross-blocking activity of antiserum of GZ2013-L10 strain VLP.

VLP 抗血清并不具有广谱性, 并且在中和保护实验中表现出只对同型的 VLP 具有阻断效果, 因此对于多价疫苗研发提出了要求。近年来, 我国在 NoV 疫苗领域也不断取得突破, 如中国科学院上海巴斯德研究所研发的四价重组疫苗已获批进入临床试验^[26], 理论上可预防 80% 以上 NoV 感染, 但是否能针对不同基因型 NoV 具备广谱性保护作用还未报道。NoV 丰富的遗传多样性为疫苗研发提出了挑战, 单纯依靠增加 NoV 抗原型别来提高其保护率的措施值得商榷。我们团队前期通过对常见 7 种 GI 基因型和 16 种 GII 基因型进行血清交叉性评价研究, 挖掘了位于 P1-2 区的潜在保守抗原表位(423-431、440-448、500-508、462-474 和 517-531), 从而为未来合理设计广谱疫苗株提供了依据^[27]。

综上所述, 本研究系统表征了 GII.4 Sydney 2012[P31]型 NoV GZ2013-L10 毒株的 VLP 功能和免疫原性特点, 发现该毒株 VLP 能与所有分泌型 HBGA 受体结合, 尤其 B 型人群与 VLP 的亲合力最高, 而不与非分泌型 HBGA 受体结合, 但有研究发现在非分泌 HBGA 受体人群中发生了 NoV 感染, 由此提出, 该流行株长期流行的原因可能是有多个受体结合位点; 同时根据抗血清的交叉反应和交叉阻断效果的评价, 发现该血清仅与相同基因型的 NoV 衣壳蛋白具有结合能力, 并且其只对同型 VLP 具有中和阻断效果, 因此为今后多价疫苗的研发选择哪一种合适的 GII.4 变异株提供了必要的参考信息, 但广谱性保护疫苗不仅仅是单纯的增加抗原型别, 有效预测和推断将来可能出现的流行变异株以及挖掘潜在的保守性表位可能是未来研发广谱性保护疫苗的趋势, 本研究结果有助于解析 GII.4 型 NoV 的流行机制及相关疫苗的研发工作。

REFERENCES

- [1] Bartsch SM, Lopman BA, Ozawa S, Hall AJ, Lee BY. Global economic burden of norovirus gastroenteritis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0151219
- [2] Shah MP, Hall AJ. Norovirus illnesses in children and adolescents[J]. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2018, 32(1): 103-118
- [3] Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MJ, et al. Taxonomy of the caliciviruses[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2000, 181(Suppl 2): S322-S330
- [4] De Graaf M, Van Beek J, Koopmans MPG. Human norovirus transmission and evolution in a changing world[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(7): 421-433
- [5] Singh BK, Leuthold MM, Hansman GS. Structural constraints on human norovirus binding to histo-blood group antigens[J]. *mSphere*, 2016, 1(2): e00049-e00016
- [6] Chhabra P, De Graaf M, Parra GI, Chan MCW, Green K, Martella V, Wang QH, White PA, Katayama K, Vennema H, et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes[J]. *The Journal of General Virology*, 2019, 100(10): 1393-1406
- [7] Sabrià A, Pintó RM, Bosch A, Bartolomé R, Cornejo T, Torner N, Martínez A, De Simón M, Domínguez A, Guix S, et al. Molecular and clinical epidemiology of norovirus outbreaks in Spain during the emergence of GII.4 2012 variant[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2014, 60(2): 96-104
- [8] Kumazaki M, Usuku S. Genetic analysis of norovirus GII.4 variant strains detected in outbreaks of gastroenteritis in Yokohama, Japan, from the 2006-2007 to the 2013-2014 seasons[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142568
- [9] Khamrin P, Kumthip K, Supadej K, Thongprachum A, Okitsu S, Hayakawa S, Ushijima H, Maneekarn N. Noroviruses and sapoviruses associated with acute gastroenteritis in pediatric patients in Thailand: increased detection of recombinant norovirus GII.P16/GII.13 strains[J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(11): 3371-3380
- [10] Pagani E, Folli F, Tofani S, Ruggeri FM, Ostanello F, Di Bartolo I. Pilot survey of norovirus in Northern Italy: an example of surveillance of norovirus gastroenteritis[J]. *Epidemiology and Infection*, 2018, 146(3): 291-296
- [11] 孙立梅, 李晖, 谭小华, 莫艳玲, 郭丽丽, 杨芬, 何剑峰, 柯昌文, 张永慧. 2012-2014 年广东省哨点医院诺如病毒 GII.4 Sydney 变异株流行状况及暴发疫情特征

- 分析[J]. 中华预防医学杂志, 2015, 49(7): 615-620
- Sun LM, Li H, Tan XH, Mo YL, Guo LL, Yang F, He JF, Ke CW, Zhang YH. Epidemiological characteristics of norovirus variant of GII.4 Sydney and the outbreaks caused by norovirus variant of GII.4 Sydney in Guangdong province, 2012–2014[J]. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 2015, 49(7): 615-620 (in Chinese)
- [12] Chan MCW, Lee N, Hung TN, Kwok K, Cheung K, Tin EKY, Lai RWM, Nelson EAS, Leung TF, Chan PKS. Rapid emergence and predominance of a broadly recognizing and fast-evolving norovirus GII.17 variant in late 2014[J]. Nature Communications, 2015, 6: 10061
- [13] Xue L, Cai WC, Gao JS, Zhang L, Dong RM, Li YL, Wu HM, Chen MT, Zhang JM, Wang J, et al. The resurgence of the norovirus GII.4 variant associated with sporadic gastroenteritis in the post-GII.17 period in South China, 2015 to 2017[J]. BMC Infectious Diseases, 2019, 19: 696
- [14] Xue L, Dong RM, Wu QP, Li YL, Cai WC, Kou XX, Zhang JM, Guo WP. Molecular epidemiology of noroviruses associated with sporadic gastroenteritis in Guangzhou, China, 2013–2015[J]. Archives of Virology, 2016, 161(5): 1377-1384
- [15] Zuo YT, Xue L, Gao JS, Liao YY, Jiang YT, Li Y, Liang YH, Wang LP, Cai WC, Cheng T, et al. Development and application of a novel rapid and throughput method for broad-spectrum anti-foodborne norovirus antibody testing[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 670488
- [16] Pang XL, Preiksaitis JK, Wong S, Li V, Lee BE. Influence of novel norovirus GII.4 variants on gastroenteritis outbreak dynamics in Alberta and the Northern Territories, Canada between 2000 and 2008[J]. PLoS One, 2010, 5(7): e11599
- [17] 李响, 杨显达, 许爽, 吴东林, 孙利伟, 沈博, 李静, 柳鸿敏. 吉林省 2012–2013 年 5 岁婴幼儿中检出诺如病毒 GII.4 Sydney(悉尼)2012 变异株[J]. 中国疫苗和免疫, 2015, 21(3): 283-288
- LI X, Yang XD, Xu S, Wu DL, Sun LW, Shen B, Li J, Liu HM, Jilin provincial center for disease control and prevention. Detection of norovirus genotype GII. 4 Sydney2012 variant from children under 5 years of age in Jilin province, 2012–2013[J]. Chinese Journal of Vaccines and Immunization, 2015, 21(3): 283-288 (in Chinese)
- [18] 王婧, 张会芳, 靳森, 谢华萍, 孔翔羽, 冯微宏, 李宇宁, 胡贵方, 何雅青, 段招军. GII.3 型诺如病毒 GZ31597 株变异情况与受体组织血型抗原结合模式分析[J]. 病毒学报, 2019, 35(1): 37-44
- Wang J, Zhang HF, Jin M, Xie HP, Kong XY, Feng WH, Li YN, Hu GF, He YQ, Duan ZJ. Analyses of variation of norovirus GII.3 strain GZ 31597 and its binding profile with human histo-blood group antigens[J]. Chinese Journal of Virology, 2019, 35(1): 37-44 (in Chinese)
- [19] 张绪富, 戴迎春, 夏仁飞, 周迎春, 吕志平. GII-4 型诺如病毒体外结合唾液 HBGA 受体的检测与分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(6): 560-562
- Zhang XF, Dai YC, Xia RF, Zhou YC, Lü ZP. Detection and analysis on the *in vitro* combination of norovirus GII type with human blood group antigen receptor in saliva[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2009, 25(6): 560-562 (in Chinese)
- [20] Karangwa CK, Parra GI, Bok K, Johnson JA, Levenson EA, Green KY. Sequential gastroenteritis outbreaks in a single year caused by norovirus genotypes GII.2 and GII.6 in an institutional setting[J]. Open Forum Infectious Diseases, 2017, 4(4): ofx236
- [21] Mallory ML, Lindesmith LC, Graham RL, Baric RS. GII.4 human norovirus: surveying the antigenic landscape[J]. Viruses, 2019, 11(2): 177
- [22] Singh BK, Leuthold MM, Hansman GS. Human noroviruses' fondness for histo-blood group antigens[J]. Journal of Virology, 2015, 89(4): 2024-2040
- [23] 董悦, 展鹏, 刘新泳. 抗诺如病毒药物及其疫苗研究新进展[J]. 药学学报, 2020, 55(4): 640-651
- Dong Y, Zhan P, Liu XY. New progress in anti-norovirus drugs and vaccines[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2020, 55(4): 640-651 (in Chinese)
- [24] Atmar RL, Baehner F, Cramer JP, Lloyd E, Sherwood J, Borkowski A, Mendelman PM, Group N2S, Al-Ibrahim MS, Bernstein DL, et al. Persistence of antibodies to 2 virus-like particle norovirus vaccine candidate formulations in healthy adults: 1-year follow-up with memory probe vaccination[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2019, 220(4): 603-614
- [25] Lucero Y, Vidal R, O'Ryan G M. Norovirus vaccines under development[J]. Vaccine, 2018, 36(36): 5435-5441
- [26] 中国科学院上海巴斯德研究所. 诺如病毒四价疫苗获批进入临床研究[J]. 高科技与产业化, 2019(7): 71
- Institut Pasteur Shanghai, Chinese Academy of Sciences. Norovirus quadrivalent vaccine enters clinical research[J]. High-Technology & Commercialization, 2019(7): 71 (in Chinese)
- [27] Gao JS, Zuo YT, Xue L, Wang LP, Liang YH, Jiang YT, Cai WC, Meng LB, Zhang JM, Ye QH, et al. Antigenic diversity of human norovirus capsid proteins based on the cross-reactivities of their antisera[J]. Pathogens: Basel, Switzerland, 2021, 10(8): 986