

## G II.17 型诺如病毒样颗粒的制备及鉴定

王竹叶<sup>1</sup>, 韩雪英<sup>2</sup>, 王国川<sup>1</sup>, 黄克<sup>1</sup>, 李娜<sup>1</sup>, 姚伦广<sup>\*1</sup>, 刘阳坤<sup>\*1</sup>

1 南阳师范学院生命科学与农业工程学院 河南省畜禽保健品工程技术中心, 河南 南阳 473061

2 西北农林科技大学动物医学院, 陕西 杨凌 712100

王竹叶, 韩雪英, 王国川, 黄克, 李娜, 姚伦广, 刘阳坤. G II.17 型诺如病毒样颗粒的制备及鉴定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 483-491

Wang Zhuye, Han Xueying, Wang Guochuan, Huang Ke, Li Na, Yao Lunguang, Liu Yangkun. Preparation and identification of Norovirus G II.17 virus-like particles[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 483-491

**摘要:**【背景】诺如病毒(Norovirus, NoV)是引发全球人类急性胃肠炎的主要食源性致病原, 具有广泛的遗传多样性, 其中 G II.17 型是亚洲地区的优势流行株, 危害最为严重。研究表明, 通过基因工程技术制备的诺如病毒样颗粒(virus-like particle, VLP)具有良好的免疫保护作用, 是目前 NoV 疫苗研发的主要思路。【目的】利用大肠杆菌(*Escherichia coli*)原核表达系统制备 G II.17 型诺如病毒的 VLP, 为 G II.17 型 NoV 疫苗的研发奠定基础。【方法】合成 G II.17 型 NoV 衣壳蛋白 VP1 的基因并克隆入 pET28a-MsyB 原核表达质粒中, 将重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)中进行表达, 通过烟草蚀纹病毒(tobacco etch virus, TEV)蛋白酶去除融合标签, 利用 His-Tag 镍柱纯化获得天然 VP1 蛋白, 利用 SDS-PAGE、Western Blot 和透射电镜对纯化后的 VP1 蛋白反应原性及其形成的结构进行初步鉴定。【结果】MsyB-VP1 融合蛋白能够以可溶形式大量表达, 其最适表达条件为: IPTG 浓度 0.8 mmol/L, 37 °C 诱导 8 h; TEV 蛋白酶酶切后的 VP1 纯化蛋白能够与鼠抗 G II.17 型 NoV VP1 多克隆抗体特异性结合, 并能够自组装形成直径约为 40 nm 的病毒样颗粒。【结论】利用原核表达系统成功制备了 G II.17 型诺如病毒 VLP, 有望成为 G II.17 型诺如病毒的候选疫苗。

**关键词:** 诺如病毒; G II.17 型; 病毒样颗粒; 原核表达

基金项目: 国家自然科学基金(31870917, 32002302); 河南省高等学校重点科研项目(19A230002); 河南省科技攻关项目(202102110097, 182102310077); 河南省“疫苗工程”高校科技创新团队项目(20IRTSTHN024); 南阳师范学院高层次人才启动专项(2017ZX012)

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (31870917, 32002302); Key Scientific Research Projects of Colleges and Universities in Henan Province of China (19A230002); The Fund of Scientific and Technological Research Project of Henan Province (202102110097, 182102310077); The Program for Innovative Research Team of Science and Technology in University of Henan Province (20IRTSTHN024); The Foundation of Nanyang Normal University (2017ZX012)

\*Corresponding authors: E-mail: YAO Lunguang: lunguangyao@163.com; LIU Yangkun: lyk19861211@163.com

Received: 2021-07-30; Accepted: 2021-10-10; Published online: 2021-10-25

## Preparation and identification of Norovirus G II.17 virus-like particles

WANG Zhuye<sup>1</sup>, HAN Xueying<sup>2</sup>, WANG Guochuan<sup>1</sup>, HUANG Ke<sup>1</sup>, LI Na<sup>1</sup>, YAO Lunguang<sup>\*1</sup>, LIU Yangkun<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> Henan Provincial Engineering and Technology Center of Health Products for Livestock and Poultry, College of Life Science and Agricultural Engineering, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, Henan, China

<sup>2</sup> College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

**Abstract:** [Background] Norovirus, featuring genetic diversity, is a major foodborne initiator of acute gastroenteritis in human worldwide. G II.17, the most destructive genotype, is a novel variant emerging in Asia from 2014 through 2015 and has been predominant in Asia. Virus-like particles (VLPs) of Norovirus, prepared by genetic engineering, are safe with high immunogenicity, which are promising candidate vaccine of Norovirus. [Objective] This paper aims to prepare G II.17 VLPs in *Escherichia coli*. [Methods] The gene encoding G II.17 capsid protein VP1 was synthesized and cloned into pET28a-MsyB vector. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3) and expressed under the induction of IPTG. The fusion tags were removed by tobacco etch virus (TEV) protease, followed by purification with His-Tag nickel column to yield the natural VP1 protein. SDS-PAGE, Western Blot, and transmission electron microscope were employed to determine the reactogenicity and structure of VP1 protein. [Results] MsyB-VP1 can be expressed in soluble form, and the optimum conditions are as follows: IPTG at 0.8 mmol/L, and 37 °C for 8 h. The purified VP1 protein digested by TEV protease can specifically bind to mouse anti-G II.17 VP1 polyclonal antibody and assemble into VLPs (diameter: about 40 nm). [Conclusion] In this study, G II.17 VLPs were prepared with *E. coli*, which can be used as the candidate G II.17 vaccine.

**Keywords:** Norovirus; G II.17; virus-like particle; prokaryotic expression

诺如病毒(Norovirus, NoV)是引起非细菌性急性胃肠炎最主要的病原体, 在全球范围内每年会导致约 6.99 亿人次发病和 21.9 万人死亡, 造成的直接医疗负担为 42 亿美元, 社会成本为 603 亿美元<sup>[1]</sup>。近年来, 我国统计的散发性腹泻病例中 NoV 检出率不断上升, 最高可达 28.57%, 已经成为我国公众健康的重大威胁<sup>[2]</sup>。由于缺乏体外培养细胞系和动物感染模型, 并且人们对 NoV 的宿主保护性免疫及病毒增殖规律认识有限, 导致目前仍无商品化疫苗上市, 因此研制安全高效的新型疫苗对 NoV 的防治具有重要的意义。

NoV 属于杯状病毒科诺如病毒属, 主要通

过粪-口途径传播, 也可以通过被病毒污染的食物和水源传播<sup>[3]</sup>。根据 NoV 主要结构蛋白 VP1 序列的差异, 其可以分为 7 个基因群(G I -G VII), 其中 G I (包含 9 个基因型)和 G II (包含 22 个基因型)是感染人类的主要基因群, 分别占 10%和 90%<sup>[4]</sup>。在这些基因型中, G II.4 型自 20 世纪 90 年代以来就一直是全球最主要的流行基因型<sup>[5]</sup>。2014 年以来, 亚洲集中出现了由 G II.17 型 NoV 引起的感染, 并逐渐向世界各地蔓延, 给全球公共安全带来了新的威胁<sup>[6]</sup>。虽然 G II.17 型目前尚未取代 G II.4 型成为最流行的优势株, 但是其有可能通过进化演变为新变异株而引发大范围的急性胃肠炎暴

发, 因此研发针对 G II.17 型 NoV 的疫苗已迫在眉睫。

病毒样颗粒(virus-like particle, VLP)由病毒的一个或多个结构蛋白组成, 在形态和免疫原性上与天然病毒颗粒相似, 能够诱导高水平的免疫应答<sup>[7]</sup>。VP1 蛋白是病毒的主要免疫原性蛋白, 在体外单独表达即可自我组装形成 VLP, 因而成为目前 NoV 疫苗的研究热点<sup>[8]</sup>。因此, 本研究应用大肠杆菌表达系统制备 G II.17 型 NoV 病毒样颗粒, 并进行纯化和鉴定, 以期 G II.17 型 NoV 疫苗的研制提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒、菌种

原核表达载体 pET28a-MsyB 由西北农林科技大学杜恩岐博士惠赠; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)和 Trans5 $\alpha$  感受态细胞, 北京全式金生物技术有限公司。

#### 1.1.2 主要试剂

*Bam*H I、*Nco* I、*Xho* I 等限制性内切酶, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 烟草蚀纹病毒(tobacco etch virus, TEV)蛋白酶、无缝克隆连接试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; TALON His-Tag 纯化树脂, TaKaRa 公司; 鼠抗 G II.17 型 NoV VP1 多克隆抗体为本实验室自制; HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 武汉三鹰生物技术有限公司。

### 1.2 VP1 基因的合成

参考 G II.17 型诺如病毒毒株衣壳蛋白 VP1 (GenBank 登录号: NC\_039475.1)的全长序列, 通过生工生物工程(上海)股份有限公司合成 VP1 基因并插入 pUC57-Amp 载体, 命名为 pUC57-VP1 质粒。

### 1.3 pET28a-MsyB-VP1 表达载体的构建及鉴定

按照无缝克隆试剂盒说明书设计 VP1 克隆引物 VP1F (5'-TGTATTTCCAGGGAGGATCCATGAAGATGGCGTCGAATGAC-3')和 VP1R (5'-GTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTTACTGAGCCCTCCTTCGCCATT-3'), 在 VP1 基因两端设计同源臂(字体加粗部分), 并在同源臂与目的基因之间添加酶切位点(下划线处)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 扩增片段长度为 1 658 bp。

以合成的 pUC57-VP1 质粒为模板, VP1F/VP1R 为引物, 进行 VP1 基因的扩增。将 PCR 扩增得到的 VP1 基因定向插入至 pET28a-MsyB 载体的 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点之间, 获得 pET28a-MsyB-VP1 原核表达载体。提取菌液 PCR 阳性菌株的质粒, 用 *Nco* I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定, 并送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序鉴定。

### 1.4 重组蛋白表达条件的优化和可溶性分析

将鉴定正确的 pET28a-MsyB-VP1 重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中, 挑取单菌落 37 °C、220 r/min 培养过夜后, 以 1:100 的比例将其接种至含有卡那霉素(50  $\mu$ g/mL)的 LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 振荡培养至  $OD_{600}$  约为 0.6 时, 分别加入终浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mmol/L 的 IPTG, 在 37 °C 下诱导 6 h 优化 IPTG 诱导浓度。然后按照上述方法在最佳 IPTG 诱导浓度下分别诱导 2、4、6、8、10 h, 探索最适的表达时间。将收获的菌体分别重悬于 1 $\times$ PBS 缓冲液(pH 7.4)中, 超声破碎菌体(300 W, 工作 5 s, 间歇 5 s, 超声 5 min)并分离上清、沉淀, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳对重组蛋白的最佳表达条件及其可溶性进行鉴定。

### 1.5 重组蛋白的纯化和标签的去除

按照最佳条件大量诱导表达目的蛋白,诱导结束后经 4 °C、12 000×g 离心 10 min 收集菌体,用 1×PBS 缓冲液(pH 7.4)重悬菌体,冰浴超声破碎(工作 5 s, 间歇 5 s, 超声 30 min)后 12 000×g 离心 10 min, 收集上清用 0.45 μm 滤膜过滤。滤液经 TALON His-Tag 纯化树脂纯化, 首先用 60 mmol/L 咪唑的缓冲液洗涤杂质蛋白, 然后用 180 mmol/L 咪唑的缓冲液洗脱目的蛋白。洗脱蛋白经超滤除去咪唑后, 按照 TEV 蛋白酶说明书对纯化蛋白进行酶切以去除 MsyB 标签。将酶切后样品再次用 TALON His-Tag 纯化树脂纯化, 直接收集流穿液即为 VP1 纯化蛋白。

### 1.6 纯化蛋白的 Western Blot 鉴定

纯化的蛋白样品经 12% SDS-PAGE 分离后转印到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上, 用 10%脱脂奶粉封闭 2 h, 用鼠抗 G II.17 型 NoV VP1 多克隆抗体作为一抗, 在 4 °C、70 r/min 摇床上孵育过夜, 用 Tris/吐温-20 缓冲液(Tris-buffered saline solution/Tween-20, TBST)将 PVDF 膜漂洗 3 次, 每次漂洗 5 min; 以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, 室温孵育 1 h, 用 1×TBST 将 PVDF 膜漂洗 3 次, 每次漂洗 5 min, 最后使用二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色液对 PVDF 膜进行显色反应。

### 1.7 VP1 蛋白的透射电镜观察和动态光散射鉴定

取 10 μL 纯化后的蛋白滴加到碳覆盖的铜网膜上, 吸附 3–5 min 后用滤纸吸去样品, 然后滴加 ddH<sub>2</sub>O 清洗铜网并吸去多余液体。最后滴加 1 滴 2%磷钨酸进行染色 2 min, 吸取染色液, 室温晾干铜网, 使用透射电子显微镜观察颗粒的形态及大小。另外, 对纯化后的 VP1 蛋白进行物理特性鉴定, 利用动态光散射对纯化后的 VP1 蛋白的水化半径进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 VP1 目的基因的扩增与鉴定

为了提高 VP1 蛋白的可溶性, 选择了 pET28a-MsyB 作为表达载体, 该载体含有可溶性标签 MsyB, 在可溶性标签的 N 端有 His6-Tag 以便于纯化, 在可溶性标签的 C 端有 TEV 蛋白酶识别位点以便于后续标签蛋白的去除, VP1 基因插入 TEV 蛋白酶识别位点后的多克隆位点以构建原核表达载体 pET28a-MsyB-VP1 (图 1)。

### 2.2 重组表达质粒 pET28a-MsyB-VP1 的构建及鉴定

将构建的重组表达质粒用 *Nco* I/*Xho* I 双酶切, 将双酶切产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 可见约 2 100 bp 的目的基因条带(图 2),



图 1 本研究构建的表达载体结构示意图  
Figure 1 Schematic diagrams of the VP1 expression vector constructed in this study.

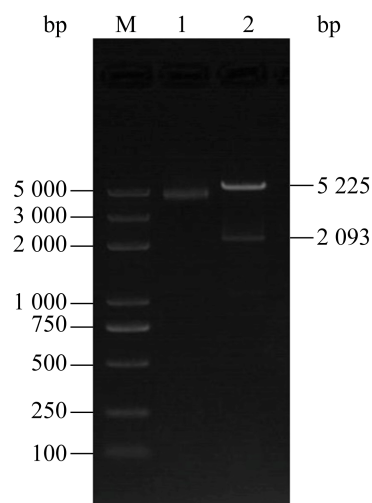


图 2 重组质粒 pET28a-MsyB-VP1 的双酶切鉴定  
Figure 2 Identification of pET28a-MsyB-VP1 by double enzyme digestion. M: Trans2K Plus DNA Marker; 1: pET28a-MsyB-VP1 plasmid; 2: pET28a-MsyB-VP1 enzymatic digestion fragment.

两者均符合预期大小。将酶切鉴定正确的重组质粒送公司测序,测序结果显示 NoV VP1 片段成功连接到表达载体,并且未出现碱基突变或缺失。

### 2.3 重组蛋白 MsyB-VP1 表达条件的优化和可溶性分析

将重组表达质粒 pET28a-MsyB-VP1 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞后,对重组蛋白的最佳 IPTG 诱导浓度和时间进行优化。收获的菌体经超声破碎分离上清和沉淀后进行 SDS-PAGE 电泳,结果表明在约 100 kDa 处出现明显的条带,与重组蛋白 MsyB-VP1 的预期大小相符;重组蛋白主要存在于超声破碎上清中,以可溶性表达为主(图 3)。同时将通过不同 IPTG 诱导浓度和诱导时间的菌体进行 SDS-PAGE 分析,确定重组蛋白 MsyB-VP1 最适表达条件为: IPTG 浓度 0.8 mmol/L, 37 °C 诱导 8 h (图 4)。

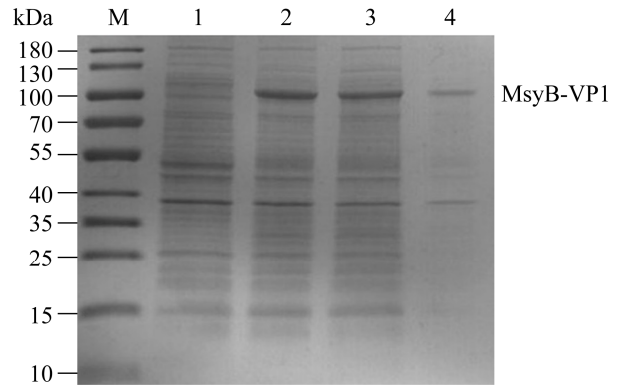


图 3 重组蛋白表达可溶性分析 M: 预染蛋白分子量标准; 1: 诱导前全菌蛋白; 2: 诱导后全菌蛋白; 3: 诱导后上清; 4: 诱导后沉淀

Figure 3 Soluble analysis of MsyB-VP1 fusion protein. M: Prestained Protein Marker; 1: Total bacteria protein before induction; 2: Total bacteria protein after induction; 3: Supernatant of ultrasonicated *E. coli* after induction; 4: Sediment of ultrasonicated *E. coli* after induction.

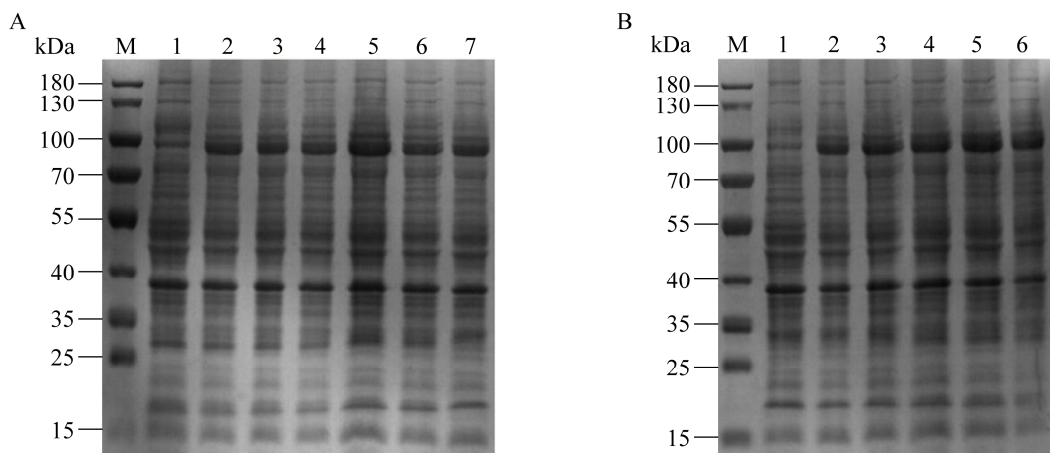


图 4 重组蛋白表达条件的优化 M: 预染蛋白分子量标准; A: 在 37 °C 条件下,重组菌以不同 IPTG 浓度(1-7: 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L)诱导 6 h; B: 在 37 °C 条件下,重组菌使用 0.8 mmol/L IPTG 诱导不同时间(1-6: 0、2、4、6、8、10 h)

Figure 4 Optimization of expression condition for MsyB-VP1 fusion protein. M: Prestained Protein Marker; A: Recombinant bacteria were induced at 37 °C with different IPTG concentrations (1-7: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 and 1.2 mmol/L) for 6 hours; B: Recombinant bacteria were induced at 37 °C with 0.8 mmol/L IPTG for different time (1-6: 0, 2, 4, 6, 8, 10 h).

## 2.4 MsyB-VP1 重组蛋白的纯化与 TEV 酶切

将大量诱导后超声破碎的上清经 TALON His-Tag 纯化树脂纯化, 纯化得到的 MsyB-VP1 重组蛋白用 TEV 蛋白酶进行酶切, 酶切后的产物采用 SDS-PAGE 鉴定。结果显示, MsyB-VP1 重组蛋白已经被纯化, 洗脱液中目的蛋白纯度较高且单一(图 5A), 而且纯化后的目的蛋白可以完全被 TEV 蛋白酶切开(图 5B)。

## 2.5 纯化 VP1 蛋白的鉴定

将 TEV 蛋白酶处理后的样品再次经 TALON His-Tag 纯化树脂纯化, 直接收集流穿液即为纯化的 VP1 蛋白。取纯化后的 VP1 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 结果显示在 60 kDa 处出现特异性条带, 与天然 VP1 蛋白大小相符(图 6A)。同时, 以鼠抗 G II.17 型 NoV VP1 多克隆抗体作为一抗进行 Western Blot 鉴定, 结果显示在目标条带处

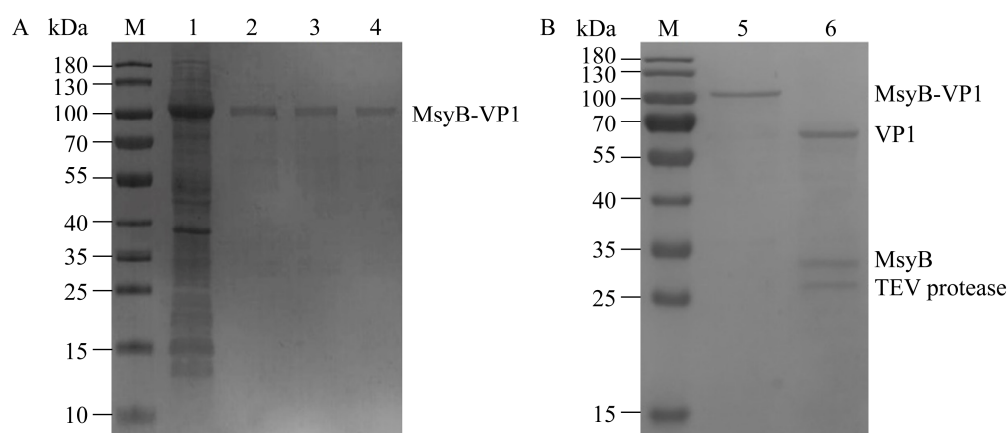


图 5 MsyB-VP1 重组蛋白的纯化与 TEV 酶切 M: 预染蛋白分子量标准; 1: 诱导后全菌蛋白; 2-5: 纯化的 MsyB-VP1 蛋白; 6: TEV 蛋白酶处理后的 MsyB-VP1 蛋白

Figure 5 Purification of MsyB-VP1 protein and TEV protease treatment. M: Prestained Protein Marker; 1: Total bacteria protein after induction; 2-5: Purified MsyB-VP1 protein; 6: Purified MsyB-VP1 protein treated with TEV protease.

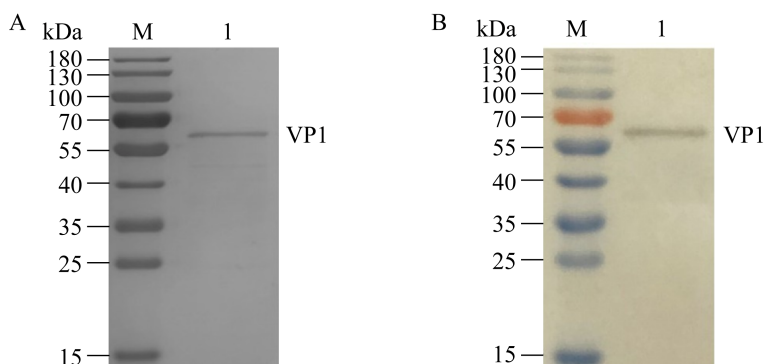


图 6 纯化 VP1 蛋白的 SDS-PAGE (A)和 Western Blot (B)分析

Figure 6 SDS-PAGE (A) and Western Blot (B) analysis of purified VP1 protein. M: Prestained Protein Marker; 1: Purified VP1 protein.



有一条明显的单一条带(图 6B), 这表明纯化得到的 VP1 蛋白具有良好的反应原性和特异性。

## 2.6 纯化 VP1 蛋白的透射电镜观察和动态光散射鉴定

将纯化得到的 VP1 蛋白进行磷钨酸负染, 在 30 000×透射电镜下观察, 可见到大小均一的颗粒样结构(图 7A)。进一步动态光散射分析表明, 超过 95%的纯化后 VP1 蛋白可以形成直径约为 40 nm 的颗粒(图 7B), 与天然病毒的颗粒大小相近, 这表明纯化的 VP1 蛋白可以组装成病毒样颗粒。

## 3 讨论与结论

作为引起全球急性病毒性胃肠炎流行和暴发的主要病原体, NoV 严重威胁着人类健康和公共安全, 受到越来越多的关注和重视。2014–2015 年, 一种新变异株 G II.17 型 NoV 在中国和日本等亚洲国家引起了大面积的急性胃肠炎暴发<sup>[9]</sup>。此后, G II.17 型在亚洲地区逐渐占据主要地位, 打破了 G II.4 型 20 余年作为优势流行毒株的局面<sup>[10]</sup>。目前, G II.17 型在全球范围内呈扩散的态势, 德国、法国、意大利等欧洲国家和美国、巴西等美洲国家均相继报

道出现了 G II.17 型诺如病毒<sup>[11–14]</sup>。与 G II.4 型相比, G II.17 型导致的疾病在发病规模、感染人数和发病程度等方面都更为严重, 亟须引起足够的重视。然而 G II.17 型病毒由于流行时间短, 关于其流行机制、变异规律、临床检测和疫苗研发等研究较为有限。因此, 开发安全高效的 G II.17 型病毒疫苗将成为预防和控制 NoV 感染的研究重点。

在 NoV 疫苗的研究中, 病毒样颗粒疫苗是目前研究的主要方向。作为 NoV 的主要衣壳蛋白, VP1 与病毒的受体识别、宿主特异性、病毒多样性及免疫原性均密切相关, 而且 VP1 蛋白体外表达后可自行组装成 VLP 颗粒, 因而成为 NoV 疫苗的研究热点<sup>[15]</sup>。截至目前, 研究人员已经通过多种表达系统实现了 VP1 蛋白的体外表达, 杆状病毒系统和酵母系统是最常用的表达系统<sup>[16–18]</sup>。真核表达系统操作复杂, 表达成本较高, 因此本研究选择 *E. coli* 原核表达系统进行 G II.17 型诺如病毒 VP1 蛋白的表达, 为 G II.17 型病毒疫苗的开发提供参考。

pET 原核表达系统具有蛋白表达量高、稳定性好、蛋白易于纯化等优点<sup>[19]</sup>, 所以本研究选择了 pET28a 原核表达载体进行 NoV VP1 蛋

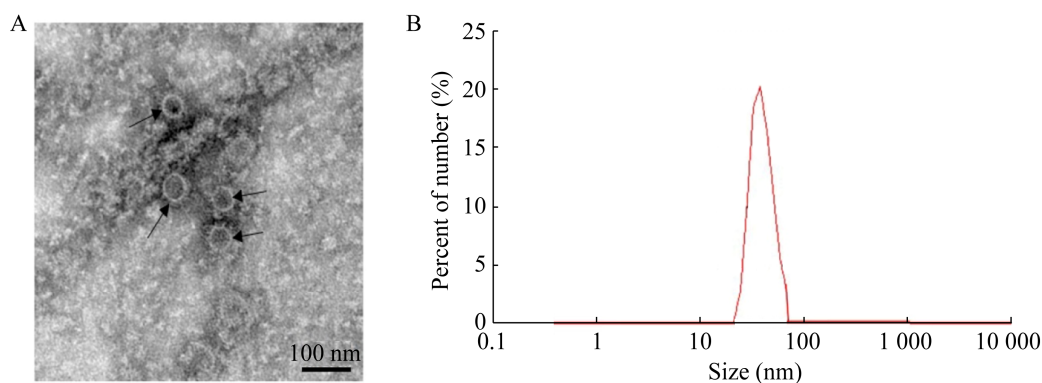


图 7 纯化 VP1 蛋白的透射电镜检测(A)和动态光散射分析(B)

Figure 7 The purified VP1 protein detected by negative staining electron microscopy (A) and dynamic light scattering (B).

白的表达。考虑到 VP1 蛋白在原核系统中常以包涵体形式表达,本实验利用超酸性蛋白 MsyB 与 VP1 融合表达实现了目的蛋白的可溶性表达,同时为了去除多余的蛋白标签以保持 VLPs 的天然结构,进一步在 MsyB 与 VP1 蛋白之间添加了 TEV 蛋白酶识别位点。通过 SDS-PAGE 电泳分析, MsyB-VP1 融合蛋白主要以可溶性形式高效表达。MsyB-VP1 纯化蛋白经 TEV 蛋白酶切割后再次纯化,可以得到不含蛋白标签且纯度较高的天然 VP1 蛋白。透射电镜结果表明, G II.17 型 VP1 蛋白形成了 VLP, 其颗粒形态与天然病毒颗粒相似,大小与真核表达系统制备的 VLP 大小一致<sup>[16-18]</sup>。Western Blot 分析显示,纯化的 VP1 蛋白可以与鼠抗 G II.17 型 NoV VP1 多克隆抗体特异性结合,表明 G II.17 型 VP1 蛋白具有良好的抗原性。

综上所述,本研究成功利用原核表达系统制备了 G II.17 型诺如病毒的 VLP,为 G II.17 型 NoV 单克隆及多克隆抗体的制备、新型疫苗研发及血清学检测方法的建立等奠定了基础。

## 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] 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 G II.4 variant associated with sporadic gastroenteritis in the post-G II.17 period in South China, 2015 to 2017[J]. BMC Infectious Diseases, 2019, 19(1): 1-8
- [3] Thorne LG, Goodfellow IG. Norovirus gene expression and replication[J]. Journal of General Virology, 2014, 95(2): 278-291
- [4] Mesquita JR, Costantini VP, Cannon JL, Lin SC, Nascimento MSJ, Vinjé J. Presence of antibodies against genogroup VI Norovirus in humans[J]. Virology Journal, 2013, 10: 176
- [5] Karst SM, Baric RS. What is the reservoir of emergent human Norovirus strains?[J]. Journal of Virology, 2015, 89(11): 5756-5759
- [6] 杜娟, 孙文俊, 房庚雨, 王帅, 刘雅琼, 崔富强, 卢庆彬. 诺如病毒 G II.17 型流行特征和基因变异进化研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(23): 3676-3680  
Du J, Sun WJ, Fang GY, Wang S, Liu YQ, Cui FQ, Lu QB. Research progress in the epidemiology and genetic evolution of Norovirus G II.17[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2019, 29(23): 3676-3680 (in Chinese)
- [7] Van Loben Sels JM, Green KY. The antigenic topology of Norovirus as defined by B and T cell epitope mapping: implications for universal vaccines and therapeutics[J]. Viruses, 2019, 11(5): 432
- [8] Devant JM, Hofhaus G, Bhella D, Hansman GS. Heterologous expression of human Norovirus G II.4 VP1 leads to assembly of T=4 virus-like particles[J]. Antiviral Research, 2019, 168: 175-182
- [9] Pu J, Kazama S, Miura T, Azrains ND, Konta Y, Ito H, Ueki Y, Cahyaningrum EE, Omura T, Watanabe T. Pyrosequencing analysis of Norovirus genogroup II distribution in sewage and oysters: first detection of G II.17 Kawasaki 2014 in oysters[J]. Food and Environmental Virology, 2016, 8(4): 310-312
- [10] 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 G II.17 variant in late 2014[J]. Nature Communications, 2015, 6: 10061
- [11] Sanchez MA, Corcostégui SP, Broucker CA, Cabre O, Watier-Grillot S, Perelle S, Ambert-Balay K, Pommier De Santi V. Norovirus G II.17 outbreak linked to an infected post-symptomatic food worker in a French military unit located in France[J]. Food and Environmental Virology, 2017, 9(2): 234-237
- [12] Van Beek J, De Graaf M, Al-Hello H, Allen DJ, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Brytting M, Buesa J, Cabrerizo M, Chan M, et al. Molecular surveillance of Norovirus, 2005-16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2018, 18(5): 545-553
- [13] Giammanco GM, De Grazia S, Bonura F, Cappa V, Muli SL, Pepe A, Medici MC, Tummo F, Calderaro A, Di Bernardo F, et al. Norovirus G II.17 as major epidemic strain in Italy, winter 2015-16[J]. Emerging Infectious Diseases, 2017, 23(7): 1206-1208
- [14] Das Neves Costa LCP, Teixeira DM, Portela ACR, De Lima ICG, Da Silva Bandeira R, Sousa Júnior EC,



- Siqueira JAM, Resque HR, Da Silva LD, Gabbay YB. Molecular and evolutionary characterization of Norovirus G II.17 in the northern region of Brazil[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2019, 19(1): 1021
- [15] 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)
- [16] Chen W, Kang T, Yuan RL, Shao CW, Jing SR. Immunogenicity and protective potency of Norovirus G II.17 virus-like particle-based vaccine[J]. *Biotechnology Letters*, 2020, 42(7): 1211-1218
- [17] 潘俊杰, 张坤明, 潘勇兵, 张囡, 闭兰. G II.17 型诺如病毒单克隆抗体的制备及鉴定[J]. *中国生物制品学杂志*, 2017, 30(11): 1168-1172, 1176
- Pan JJ, Zhang KM, Pan YB, Zhang N, Bi L. Preparation and characterization of monoclonal antibody against G II.17 type Norovirus[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2017, 30(11): 1168-1172, 1176 (in Chinese)
- [18] 王文辉, 万鑫, 霍玉奇, 凌同, 丁力, 孟胜利, 王泽鋆, 申硕. G II.17 型诺如病毒多克隆抗体的制备及应用[J]. *微生物学免疫学进展*, 2017, 45(2): 1-7  
Wang WH, Wan X, Huo YQ, Ling T, Ding L, Meng SL, Wang ZJ, Shen S. Generation and application of rabbit anti-G II.17 NoV polyclonal antibody[J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2017, 45(2): 1-7 (in Chinese)
- [19] Xu JQ, Dong F, Wu MX, Tao RS, Yang JJ, Wu MB, Jiang Y, Yang S, Yang LR. *Vibrio natriegens* as a pET-compatible expression host complementary to *Escherichia coli*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 627181