

研究报告

广州地区 GII.17 型诺如病毒 GZ-L343 毒株病毒样颗粒的构建与免疫特征的鉴定

孟洛冰^{#1,2}, 薛亮^{#2}, 高珺珊², 王林平², 缪水娣², 任少雷², 张菊梅², 王涓², 古其会², 吴清平^{*2}

1 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510641

2 广东省科学院微生物研究所 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

孟洛冰, 薛亮, 高珺珊, 王林平, 缪水娣, 任少雷, 张菊梅, 王涓, 古其会, 吴清平. 广州地区 GII.17 型诺如病毒 GZ-L343 毒株病毒样颗粒的构建与免疫特征的鉴定[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 4168-4179.

MENG Luobing, XUE Liang, GAO Junshan, WANG Linping, MIAO Shuidi, REN Shaolei, ZHANG Jumei, WANG Juan, GU Qihui, WU Qingping. Construction and immune characterization of virus-like particles of GII.17 norovirus strain GZ-L343 in Guangzhou[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 4168-4179.

摘要:【背景】人源诺如病毒是急性胃肠炎暴发的主要原因, GII.4 是过去几十年的主要流行基因型。2014/2015 年出现的 GII.17 型变异株是中国首例导致大规模暴发的非 GII.4 流行株。通过对来自华南地区的诺如病毒 GII.17 型毒株的完整基因组序列进行分析, 证实了该 GII.17 型突变株与先前确定的 GII 型变异株不同。【目的】制备广州地区 GII.17 型诺如病毒 GZ-L343 的病毒样颗粒, 并系统表征其免疫原性及功能特性。【方法】借助杆状病毒表达系统制备 GII.17-GZ-L343 的病毒样颗粒, 并通过氯化铯梯度超速离心对其进行纯化, 制备抗血清并对其免疫功能进行评价。【结果】聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白质免疫印迹结果表明所得蛋白分子量大小约为 58 kDa; 透射电镜结果表明病毒样颗粒直径约为 30 nm; 酶联免疫吸附测定结果显示该病毒样颗粒具有较好的免疫原性; 唾液组织血型抗原的体外受体结合测定表明, 该病毒样颗粒与部分 A 型、B 型、O 型及 AB 型分泌及非分泌血型样本存在阳性结合; 效价测定结果表明免疫所得血清效价在 10^4 以上; 交叉反应结果表明该抗血清与异型病毒样颗粒不存在交叉反应。此外, 体外阻断结果表明, 该抗血清仅能阻断相应型别病毒样颗粒与受体的结合作用, 与异型病毒样颗粒不存在交叉阻断。【结

资助项目: 国家自然科学基金(32272436); 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

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32272436), the Natural Science Foundation of Guangdong Province for Distinguished Young Scholars (2019B151502065), and the Key Research and Development Program of Guangdong Province (2019B020209001).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: wuqp203@163.com

Received: 2023-01-06; Accepted: 2023-03-22; Published online: 2023-05-08

论】 GII.17-GZ-L343 具有广泛的结合谱, 其抗血清对异型病毒样颗粒不具有广谱性, 且只对同型病毒样颗粒存在阻断作用, 结果将为进一步揭示该病毒的宿主适应特性、进化机制及研发多价疫苗提供理论支持。

关键词: 诺如病毒; 病毒样颗粒; 免疫特征; 受体结合

Construction and immune characterization of virus-like particles of GII.17 norovirus strain GZ-L343 in Guangzhou

MENG Luobing^{#1,2}, XUE Liang^{#2}, GAO Junshan², WANG Linping², MIAO Shuidi², REN Shaolei², ZHANG Jumei², WANG Juan², GU Qihui², WU Qingping^{*2}

1 School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, Guangdong, China

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

Abstract: [Background] Human norovirus is regarded as the leading cause of the outbreak of acute gastroenteritis with GII.4 being the predominant genotype during the past decades. The GII.17 variant that emerged in 2014/2015 was the first non-GII.4 epidemic strain causing a large-scale epidemic in China. The full-length genome sequencing of the GII.17 strain from South China confirmed that it was different from the previously identified GII variants. **[Objective]** To prepare the virus-like particles and systematically characterize the immunogenicity and functions of GII.17-GZ-L343 in Guangzhou. **[Methods]** The baculovirus expression system was employed to produce GII.17-GZ-L343 in Sf9 insect cells. The virus-like particle was purified by cesium chloride gradient ultracentrifugation. Finally, the antiserum was prepared and its immune function was evaluated. **[Results]** The results of SDS-PAGE and Western blotting showed that the molecular weight of the obtained protein was about 58 kDa. The prepared virus-like particle had a diameter of about 30 nm, good immunogenicity, and binding activities to the saliva of type A/B/O/AB secretors and non-secretors. The serum titer after immunization was above 10^4 , and the antiserum had no inhibitory effects on other variants. In addition, the antiserum only blocked the binding of homotypic virus-like particle to the receptor, and did not block the binding of heterotypic virus-like particle. **[Conclusion]** GII.17-GZ-L343 has a broad binding pattern. Its antiserum is not broad-spectrum for heterotypic virus-like particle and only has blocking effect on homotypic virus-like particle. The results provide theoretical support for further revealing the host adaptation characteristics and evolution mechanism of the virus and developing multivalent vaccines.

Keywords: norovirus; virus-like particle; immune signature; receptor binding

诺如病毒(norovirus, NoV)是急性胃肠炎(acute gastroenteritis, AGE)的主要原因,可感染所有年龄段人群^[1-2]。该病毒通常在冬季暴发于学校、医院、军事设施和邮轮等封闭环境中。NoV 具有高度传染性和快速传播能力,造成了严重的疾病负担。据估计, NoV 在全球引起约 6.84 亿例 AGE, 占全球 AGE 病例的近五分之一, 社会经济损失超过 600 亿美元^[3]。NoV 具有高度传染性, 因此疫情一般难以控制。

NoV 属于杯状病毒科(*Caliciviridae*)诺如病毒属, 具有线性、单链、正义 RNA 基因组, 包含 3 个开放阅读框(open reading frame, ORF)^[4]。ORF1 编码一个大的多聚蛋白, 该多聚蛋白被病毒编码的 3c 样半胱氨酸蛋白酶翻译后裂解成 7 个非结构蛋白(p48 [NS1/2]、NTPase [NS3]、p22 [NS4]、VPg [NS5]、病毒蛋白酶[NS6]和病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶[RdRp, NS7]), ORF2 和 ORF3 分别编码主要衣壳蛋白和次要衣壳蛋白(VP1 和 VP2)^[5]。VP1 是一种 60 kDa 的蛋白质, 可分为壳结构域(S 结构域)和突出结构域(P 结构域)^[6]。S 结构域在病毒 RNA 周围形成支架并负责衣壳的外壳结构, P 结构域包含中和表位并可与血型组织抗原(histo-blood groups antigen, HBGA)受体结合, 促进衣壳蛋白形成二聚体^[7], 构建病毒尖峰并促进细胞附着^[8]。成熟的病毒样颗粒(virus-like particle, VLP)包含 180 个 VP1 蛋白, 组成 90 个二聚体, 形成二十面体对称结构。VP2 具有稳定和促进 VP1 表达的功能^[9]。基于完整 VP1 的氨基酸多样性, NoV 被分为至少 10 个基因组(GI-GX)共 48 种基因型^[10]。

HBGA 是 NoV 的天然受体或协同因子^[11], 不同 HBGA 表型的个体与 NoV 结合能力不同。其主要存在于组织细胞表面或体液分泌物中, 通过结合衣壳蛋白 VP1 突出结构域来发挥细胞附着因子的作用。早期的 GII.17 突变株与 HBGA

的结合能力较弱, 这可能是其流行率低的原因。2014 年后变异株 GII.17 衣壳表面结合口袋周围的氨基酸迅速进化, 改变了 HBGA 和抗体结合的亲和力^[12]。一方面, 进化可以使这些病毒与不同的 HBGA 受体结合, 这表明对一种大流行毒株有抗性的个体可能对另一种病毒株敏感; 另一方面, 微小的序列和结构差异使这些病毒能够逃脱预先存在的群体免疫, 最终导致新毒株的出现, 这些毒株有能力感染以前感染过的相同个体。虽然分析了新报道 GII.17 变异株的流行病学和遗传学^[13], 但仍有必要进一步探究其高患病率的根本原因。目前, NoV GII.17 变异株之间广泛的抗原关系仍然未知, 宿主保护性免疫与病毒抗原异质性之间的复杂关系成为疫苗开发的主要障碍。

NoV 突变株的出现及大规模流行给全球带来了巨大威胁, 作者所在课题组以实验室保存的 NoV 为研究对象^[14-15], 建立了 NoV 遗传与抗原多样性的关系^[16], 并表征了 NoV GII.17 簇与人类唾液中 HBGA 的结合谱^[17], 为合理设计具有广泛交叉保护作用的多表位疫苗奠定了基础。本研究在课题组前期工作基础上, 以 GII.17-GZ-L343 型 NoV 毒株为研究对象, 对 GII.17 与不同基因型间抗原抗体交叉反应进行全面分析, 表征了抗血清的广谱性, 以期进一步了解基因型间的交叉保护作用, 为 NoV 疫苗的设计和基因型的选择提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

GII.17-GZ-L343-ORF2 质粒和 pFastBac1 载体保存于实验室; 46 份唾液样本^[18]采集自华南应用微生物国家重点实验室(表型鉴定完成于广州医科大学检验科); SPF 级 BALB/c 雄性小鼠购自

广东省医学实验动物中心获得了动物护理和使用委员会批准, 批准号: GT-IACUC202102252; GII.3、GII.4 和 GII.8 型 VLP 为实验室前期制备; GII.17-GZ-L343 毒株来自团队前期对广州腹泻临床样本的监测取样^[19]; 大肠杆菌 DH10Bac、Sf9 昆虫细胞保存于团队实验室-80 °C 冰箱(27 °C 有氧条件下贴壁培养); *E. coli* DH5 α 感受态细胞购于生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

28 种基因型衣壳 P 蛋白及相应的抗血清为实验室早期制备^[16], Prime STAR[®] Max DNA Polymerase 购自宝日医生物技术(北京)有限公司; 杆状病毒载体质粒提取试剂盒和 BeyoECL Moon 购自上海碧云天生物技术有限公司; 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-gal)、QuickCut[™] BamH I 及 QuickCut[™] Sph I 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司; SIM SF 和 Sinofection 购自北京义翘神州科技股份有限公司; LB 琼脂培养基、LB 肉汤培养基、庆大霉素(gentamicin)、卡那霉素(kanamycin)、四环素(tetracycline)、DL5000 DNA Marker 购自广东环凯微生物科技有限公司; PGM (pig gastric mucin type III) 购自 Sigma 公司; 异丙基- β 代半乳糖苷(IPTG)和氨苄青霉素(ampicillin)购自北京全式金生物技术股份有限公司。

1.1.3 培养基

氨苄抗性 LB 琼脂平板(g/L): tryptone 10.0, yeast extract 5.0, NaCl 10.0, agar 15.0, ampicillin 0.1; LB 抗性筛选平板(g/L): X-gal 0.100, IPTG 0.040, kanamycin 0.050, tetracycline 0.010, gentamicin 0.007。

1.2 方法

1.2.1 引物设计及目的片段扩增

II.17-GZ-L343 菌株的特异性引物用 Primer

Premier 5.0 设计并送至北京六合华大公司合成, 限制性内切酶位点为 BamH I 和 Sph I。以 GII.17-GZ-L343 菌株基因组为模板扩增全长主衣壳蛋白(VP1)核苷酸序列, PCR 反应体系(50 μ L): 模板(75 ng/ μ L) 2 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 高保真酶预混液 25 μ L, ddH₂O 21 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 98 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。

1.2.2 杆状病毒载体的构建

首先, 使用 QuickCut[™] BamH I 及 QuickCut[™] Sph I 双酶切 pFastBac1 载体并利用 Infusion 酶连接目的片段与酶切后载体, 将连接产物转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中 37 °C 培养过夜。次日, 在 0.1% 氨苄抗性 LB 琼脂平板上挑取阳性菌落进行 PCR 鉴定, 北京六合华大公司测序验证成功的菌落。将测序成功的 pFASTBac-GII.17 载体纯化的质粒 DNA 转入 *E. coli* DH10Bac[™] 感受态细胞, 涂布于 LB 抗性筛选平板[X-Gal (100 μ g/mL)、IPTG (40 μ g/mL)、卡那霉素(50 μ g/mL)、四环素(10 μ g/mL)和庆大霉素(7 μ g/mL)], 并设置野生型杆状病毒作为对照组。37 °C 培养过夜, 挑选白色单菌落进行菌落 PCR 并进行 DNA 凝胶电泳验证。菌落 PCR 反应体系(20 μ L): 模板 1 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L)各 0.6 μ L, *Ex Taq* 酶 10 μ L, ddH₂O 7.8 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 98 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。

1.2.3 NoV GII.17 VLP 的生产及纯化

将经 PCR 验证正确的重组质粒 DNA 转染到 Sf9 细胞, 借助转染试剂与杆状病毒的作用, 实现病毒样颗粒的组装, 收集上清获得 P1 代杆状病毒。将收集的 P1 代毒换入 T25 培养瓶(无血清, 4 h, 密度 2.0×10^6), 之后取 P1 代进行攻毒并培养 48–72 h 即可得到 P2 代杆状细胞。使

用 P2 代上清大量表达蛋白后 4 °C、7 000 r/min 离心 10 min 获得细胞沉淀(保留上清), 超声沉淀(功率 35 W, 时间 30 min, 超声 6 s, 暂停 6 s)并在磷酸盐缓冲溶液(PBS)中洗涤裂解细胞, 再次 4 °C、7 000 r/min 离心 10 min 取上清。将 2 次上清混合并加入 0.5 mol/L NaCl、7% (质量体积分数) PEG 6000 沉降过夜, 次日 4 °C、10 000 r/min 离心 30 min 收集沉淀。之后用 PBS 溶解沉淀, 并用等体积的 1.4 g/mL 氯化铯溶液混合后置于超离管, 288 000 r/min 超速离心 24 h 收取目的条带, PBS 重悬沉淀, 8 °C、141 000 r/min 离心 3 h 去除氯化铯溶液, 所得沉淀即为 GII.17-VLP。

1.2.4 重组蛋白鉴定

用 NanoDrop 2000 对纯化后的蛋白进行定量, 然后用磷钨酸对纯化的 1 µg/µL GII.17 VLP 进行负性染色, 通过透射电子显微镜进行观察。取纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳并验证蛋白迁移是否正确, 通过湿转仪按照湿式转模三明治排列方式将蛋白条带转印至 PVDF 膜上, 经 5% (质量体积分数)脱脂奶粉封闭 2 h。去除封闭液后立即加入到稀释好的一抗(抗 GII.17 衣壳 P 颗粒血清)溶液中, 室温缓慢摇动孵育 1 h, 之后用 PBST 低速摇动漂洗 10 min, 并重复 5 次。然后用二抗稀释液按 1:3 000 体积比稀释 Goat Anti-Mouse IgG, 并于低速摇床 37 °C、20 r/min 孵育 30 min。之后加入 PBST 20 r/min 摇动 10 min 清洗并重复 5 次。ECL 显影的发光液(A 液, B 液)按体积比 1:1 避光配制后吸取 100 µL 覆盖于 PVDF 膜上。纯化后的蛋白通过间接 ELISA 进行活性验证, 首先将蛋白浓度稀释为 1 µg/mL, 37 °C 包被 2 h, 随后用 PBST 洗板 5 次, 用 5% (质量体积分数)脱脂奶粉 37 °C 封闭 2 h, PBST 洗板 5 次。加入按 1:10 000 体积比稀释的一抗(抗 GII.17 衣壳 P 颗粒血清)溶液, 37 °C 孵育 1 h, PBST 振荡洗板

5 次。加入体积比 1:3 000 稀释的酶标二抗 Goat Anti-Mouse IgG, 室温孵育 0.5 h, PBST 振荡洗板 5 次, 室温条件下加入 TMB (注意避光)孵育 7–10 min 后, 每孔加入 50 µL 2 mol/L H₂SO₄ (ELISA 终止液)静置 2 min, 酶标仪测定 OD₄₅₀ 值。

1.2.5 小鼠免疫及抗血清制备

从 5 只 SPF 级 BALB/c 雄性小鼠 7 周龄开始, 分别在第 0、2、4 和 5 周皮下注射 10 µg 纯化后的 VLP。收集免疫前的血清作阴性对照, 首次免疫时将 VLP 与等体积弗氏完全佐剂混合并乳化, 加强免疫时将 VLP 与弗氏不完全佐剂混合并乳化。之后在四免后第 1 周, 收集血清样本。通过微量离心机在 5 000 r/min 条件下分离血清。将血清样品转移至 1.5 mL 微量离心管中, 保存在-80 °C 冰箱备用。

1.2.6 抗血清交叉反应

将 28 种基因型衣壳 P 蛋白分别稀释成 1 µg/mL, 100 µL/孔, 37 °C、2 h 或 4 °C 过夜包被, 随后用 PBST 振荡洗板 5 次后, 按 200 µL/孔加入用 PBS 配制的 5% (质量体积分数)的脱脂奶粉, 37 °C 封闭 2 h 后用 PBST 振荡洗板 5 次。按 100 µL/孔加入体积比 1:10 000 稀释的一抗溶液(抗 GII.17 VLP 抗血清), 阴性对照加入阴性血清, 37 °C 孵育 1 h 后洗板, 步骤同上。每孔 100 µL 加入按 1:3 000 体积比稀释的酶标二抗 Goat Anti-Mouse IgG, 37 °C 孵育 30 min 后振荡洗板, 步骤同上。按 100 µL/孔加入 TMB, 37 °C 避光反应 8–10 min。待反应结束后, 按 50 µL/孔加入终止液(2 mol/L H₂SO₄), 酶标仪上测 OD₄₅₀ 值, 每组试验重复 3 组平行。

1.2.7 受体结合功能验证

将不同血型的唾液样本按体积比 1:1 000 稀释后, 4 °C 包板过夜。其中阳性对照包板 PGM, 阴性对照包板 PBS。PBST 振荡洗板 5 次, 每孔加入 5% (质量体积分数)脂奶粉 200 µL,

37 °C 孵育 2 h。之后加入 PBST 振荡洗板, 重复 5 次, 加入浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 GII.17-VLP, 37 °C 孵育 1 h。PBST 振荡洗板 5 次, 一抗按体积比 1:10 000 稀释 GII.17 型 VLP 的抗血清, 37 °C 孵育 1 h。PBST 洗板 5 次, 每孔 100 μL 按体积比 1:3 000 加入稀释的酶标二抗 Goat Anti-Mouse IgG, 37 °C 孵育 30 min。弃去二抗后 PBST 振荡洗板 5 次, 每孔加入 100 μL TMB, 37 °C 避光静置 8–10 min, 最后按 50 μL /孔加入 ELISA 终止液, 静置 2 min 后测定 OD_{450} 值。

1.2.8 抗血清体外阻断试验

首先将不同人类唾液样本以体积比 1:1 000 稀释后, 每孔 100 μL 加入到酶标板中, 并于 37 °C 2 h 或 4 °C 包被过夜。随后用 PBST 振荡洗板 4 次后, 用 PBS 稀释脱脂奶粉至 5% (质量体积分数), 每孔加入 200 μL 并在 37 °C 下孵育 2 h, 随后振荡洗板 5 次。鼠多抗血清按 1:100 倍比稀释并与 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 GII.17-VLP 等体积混

匀, 按 100 μL /孔加入 96 孔板中, 并于 37 °C 孵育 1 h 后洗板, 步骤同上。按 100 μL /孔加入体积比 1:3 000 稀释的酶标二抗 Goat Anti-Mouse IgG, 37 °C 孵育 30 min 后洗板, 步骤同上。按 100 μL /孔加入 TMB, 37 °C 避光反应 8–10 min, 待反应结束后, 按 50 μL /孔加入终止液 (2 mol/L H_2SO_4), 酶标仪上测 OD_{450} 值, 每组试验重复 3 组平行。试验过程中要同时设定不加入抗血清的 VLP 和只加入 PBS 的样品作为对照组。

2 结果与分析

2.1 杆状病毒表达载体的构建

QuickCut™ *Bam*H I 及 QuickCut™ *Sph* I 双酶切 pFastBac1 载体后利用 Infusion 连接酶连接目的片段与载体, 之后转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中培养过夜, 次日挑取阳性菌落进行 PCR 验证, 凝胶电泳图上出现明亮条带, 位置在 1 700 bp 处 (图 1A)。测序结果与 SnapGene 中

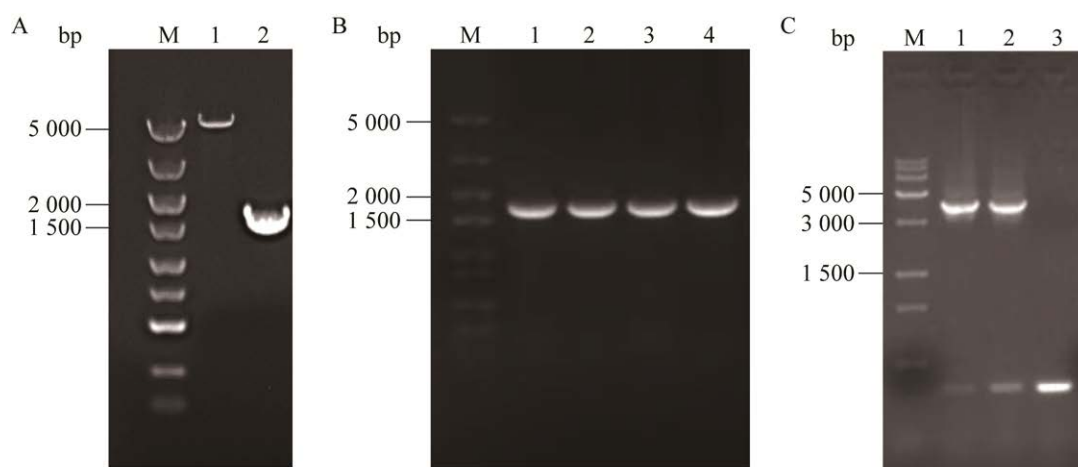


图 1 重组杆状病毒载体构建及鉴定 A: 双酶切载体及目的片段(1: 载体; 2: 目的片段). B: 重组转座质粒 pFastBac-GII.17 的菌落 PCR 鉴定(1–4: 阳性克隆). C: 重组质粒 Bacmid-GII.17 的菌落 PCR 鉴定(1–2: 阳性克隆; 3: 阴性对照, 野生型杆状病毒). M: DL5000 DNA Marker

Figure 1 Construction and identification of the recombinant baculovirus vector. A: Double enzyme digestion vector and target fragment (1: Vector; 2: Target fragment). B: Colony PCR identification of the recombinant transposon plasmid pFastbac1-GII.17 (1–4: Positive clone). C: Colony PCR identification of the recombinant Bacmid-GII.17 by colony PCR (1–2: Positive clone; 3: Negative control, wild type baculovirus). M: DL5000 DNA Marker.

预期 VP1 序列进行比对, 结果显示准确无误, 表明 pFastBac-GII.17 构建成功。随后, 将 pFASTBac-GII.17 载体纯化的质粒 DNA 转入 *E. coli* DH10Bac™ 感受态细胞, 涂布于含有不同抗生素的抗性平板上进行筛选后挑取阳性菌落进行 PCR 验证, 可见扩增产物在约 4 000 (2 300+1 700) bp 处有单一明显条带(图 1B), 而野生型杆状病毒的 PCR 产物大小在 300 bp 左右, 说明重组杆状病毒质粒(Bacmid-GZ2015-L343)构建成功。

2.2 NoV GII.17 VLP 在 Sf9 细胞中的表达与表征

将重悬后的重组蛋白进行 2 次超速离心(第 1 次: 8 °C、288 000 r/min、24 h 收取目的条带; 第 2 次: PBS 重悬沉淀, 8 °C、141 000 r/min、3 h 去除氯化铯溶液), 收集纯化产物后经 1% 琼

脂糖凝胶验证。图 2A 结果显示质粒 Bacmid-GZ2015-L343 可在昆虫细胞中成功表达, 其蛋白条带出现在约 58 kDa 处, 无特异性条带出现在野生型杆状病毒侵染的 Sf9 细胞中; 如图 2B 所示, 透射电子显微镜显示了 VLP 的纯度和完整性(约为 30 nm); 图 2C Western blotting 结果证实了 GII.17 VLP 的免疫原性。来自 VLP 免疫小鼠的所有血清均表现出对 GII.17 VLP 的高结合亲和力(OD_{450} 为 1.054), 而对照组未表现出显著的反应性(图 2D)。这些结果表明, 是 VLP 而不是对照抗原免疫小鼠可诱导 GII.17 VLP 特异性抗体应答。

2.3 抗血清的广谱性测定

经 ELISA 测定, 5 只小鼠免疫后所得抗血清的效价依次为 2×10^4 、 4×10^4 、 4×10^4 、 8×10^4

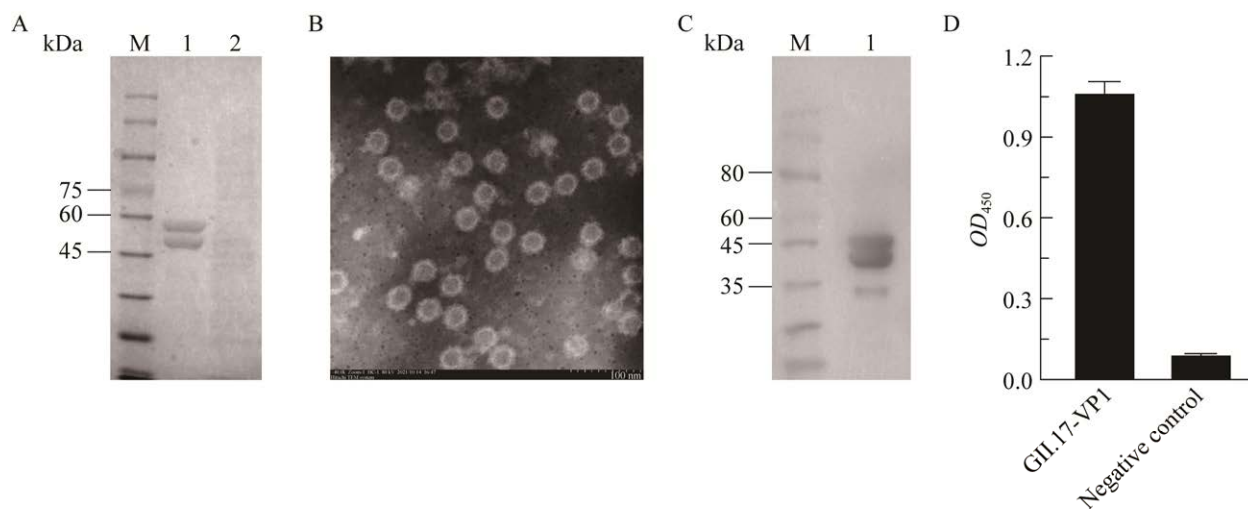


图 2 重组蛋白的表达与鉴定 A: GZ-L343 毒株病毒颗粒的 SDS-PAGE 鉴定(1: 纯化后的重组蛋白; 2: 阴性对照-感染野生型杆状病毒的 Sf9 细胞). B: GZ-L343 毒株病毒颗粒的透射电镜观察(40 000×). C: GZ-L343 毒株病毒颗粒的 Western blotting 鉴定(1: 纯化后的重组蛋白; M: 蛋白 Marker). D: GZ-L343 毒株病毒颗粒的间接 ELISA 鉴定(阴性对照: PBS; $n=3$)

Figure 2 Expression and identification of the recombinant proteins. A: SDS-PAGE identification of virus-like particle GZ-L343 (1: Purified recombinant protein; 2: Negative control-uninfected normal Sf9 cells). B: Transmission electron microscopy observation of virus-like particle of GZ-L343 Strain (40 000×). C: Western blotting identification of virus-like particle GZ-L343 (1: Purified recombinant protein; M: Protein Marker). D: ELISA identification of virus-like particle GZ-L343 (Negative control: PBS; $n=3$).

和 8×10^4 。交叉反应结果显示, 抗血清只能与相应型别衣壳蛋白发生交叉反应, 而与异型衣壳蛋白不存在交叉反应(图 3), 表明利用该重组蛋白免疫小鼠刺激机体产生的抗体不具有广谱性。

2.4 NoV GII.17 VLP-HBGAs 体外结合测定

对于体外 VLP-HBGA 结合的测定,使用了从 A 型、B 型、AB 型和 O 型血个体收集的 46 个唾液样本。分析阴性对照吸光值,选取

$OD_{450} < 0.15$ 作为阴性, OD_{450} 和阴性的比值大于 2.1 判定为阳性。如图 4 所示, 体外结合测定结果显示, VLP 分别与 B 型、O 型、AB 型和部分非分泌型唾液 HBGA 结合。此外, 观察到与 A 型唾液 HBGA 的弱结合(A、B、O 和 AB 为不同分泌型唾液样本; 非分泌型唾液样本以 N 表示)。其中, GII.17 与 13 例非分泌型 HBGA 受体最大 OD_{450} 值为 0.87, 均值为 0.368。其中结

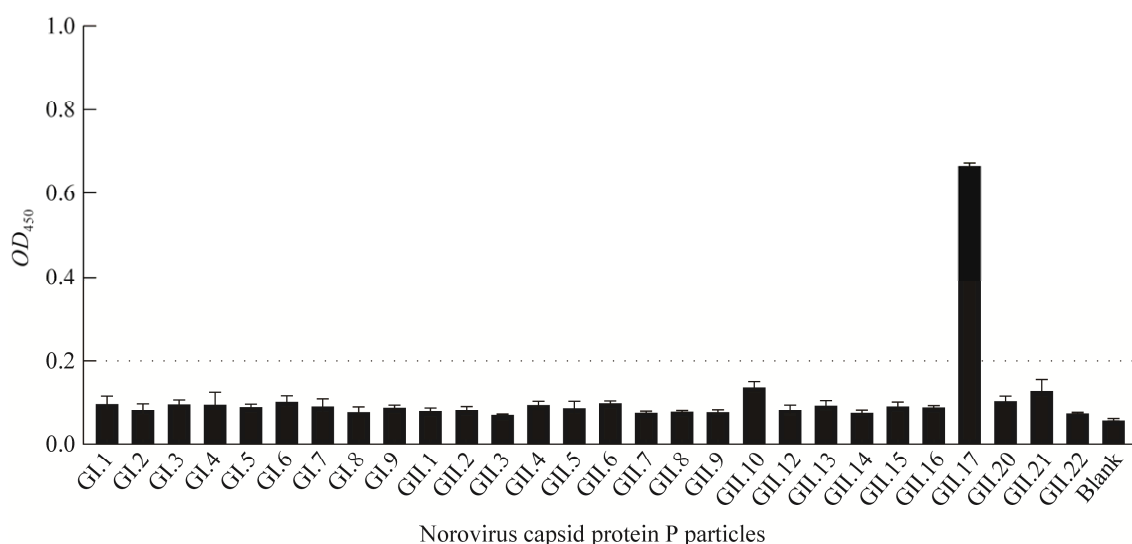


图3 抗血清的交叉反应 相同条件下一式三份进行重复试验

Figure 3 Cross-reactivity of antiserum. Three replications of the study were performed in triplicate under the same conditions.

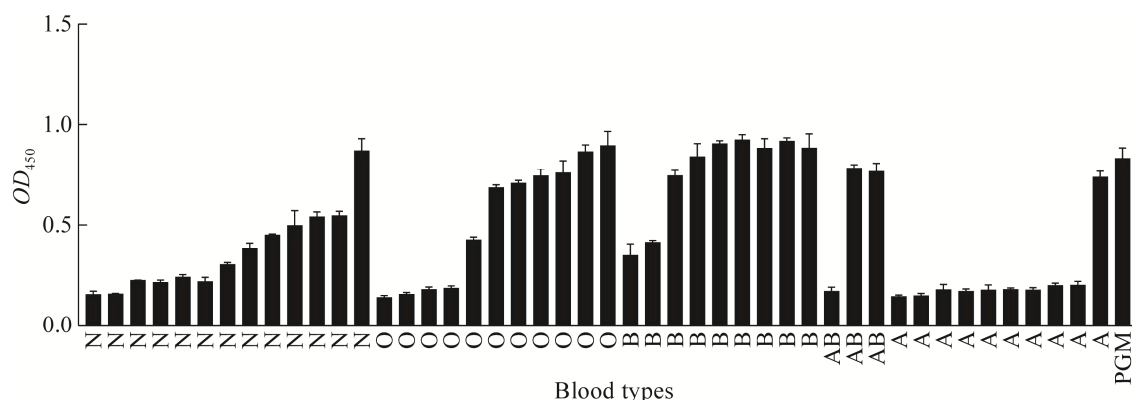


图 4 重组蛋白的受体结合功能验证 结果以 3 次重复试验的平均数 \pm 标准差表示

Figure 4 Receptor binding function of the recombinant proteins. Results were represented as mean±standard deviation of triplicate experiments.

合 HBGA 受体的 OD_{450} 值在不同分泌型表现为: B 型>AB 型>O 型>A 型, 表现出较为广泛的受体结合谱(阳性对照: PGM; 阴性对照: PBS)。

2.5 抗血清的体外阻断

为探究病毒进化过程中的跨型别保护作用, 我们测定了 GII.17 型抗血清与其本身及其他 3 个型别 VLP 的交叉阻断能力。相同条件下一式三份进行重复试验, 结果表明, 该重组蛋白免疫小鼠仅能诱导机体产生相应型别的阻断抗体, 而不能阻断异型 VLP (GII.3、GII.4 和 GII.8)与 HBGA 的结合(图 5), 对应 50%阻断滴度(the 50% blocking titer, BT_{50})为 484 (95% CI, 35–1 702)。

3 讨论与结论

NoV 是全球急性病毒性胃肠炎的主要病原体。近几十年来, GII.4 型 NoV 在全球胃肠炎流行病中占主导地位。2014–2015 年冬季, 一种新的 GII.17 型变异株出现并持续流行, 导致日本和中国华南地区暴发大规模 AGE^[20,21]。GII.17 型突变株患病率的突然增加可能与病毒的某些未知因素变化有关。例如, 病毒衣壳抗原表位的变化可能导致其具备快速传播及新适应性优势。此外, HBGA 结合位点或其周围区域的变化也可能导致宿主范围的扩大。这种新突变株

的起源、进化和分子流行病学在很大程度上是未知的, 解决这些问题对于研发高效 NoV 疫苗及制定病毒防控策略非常重要。因此, 本研究成功制备了 GII.17 型 VLP, 并对其受体结合功能及免疫原性进行了系统表征。

先前的研究表明, HBGA 表型与 NoV 感染之间存在很强的关联, 是影响 NoV 患病率的重要因素。例如, GII.4 型 NoV 识别所有分泌型受体^[22]。目前一些研究中 HBGA 与 NoV 感染的相关性尚未得到肯定, 如 GII.4 型 NoV P 域可以识别多种 HBGA 类型^[23], 并且存在株特异性。例如, Boxer 株可与非分泌型唾液结合, DSV 和 VA115 株则不能识别任何 HBGA^[24]。本研究中 GII.17 型 NoV VLP 与分泌型(A、B、O 和 AB)唾液受体、PGM 及非分泌型唾液受体均呈现一定的结合作用, 并且与 B 型唾液受体结合的 OD_{450} 值最高。通过与祖先株进行氨基酸序列比对, 发现新变异株具有显著的序列突变, HBGA 的结合位点中观察到 2 个氨基酸突变, 在结合位点的周围区域观察到其他 4 个突变^[25], 这些突变可能导致 GII.17 突变体的 HBGA 结合特性发生变化, 进而扩大其宿主范围使其变得更加普遍。

自然感染 NoV 后获得的免疫力是短暂的(小于 2 年)^[26]。因此, 疫苗接种后阻断抗体反应的强度和持续时间至关重要。在真核系统表达的 NoV 衣壳蛋白 VP1 可自组装形成 VLP, 能够刺激机体产生较为强烈的抗体反应^[27–28], 被广泛应用于研究该病毒的进化机制及疫苗设计^[29]。VP1 蛋白中的 P2 结构域能够很好地与潜在的中和抗体及 HBGA 配体相互作用, 该结构域的突变可能对病毒受体结合和宿主对病毒感染的免疫应答有显著影响^[30]。团队前期针对常见基因型(7 种 GI 基因型、16 种 GII 基因型)衣壳 P 蛋白序列进行了比对, 所有基因型中保守位点只有 58 (16.5%)个^[16]。此外还发现了高度

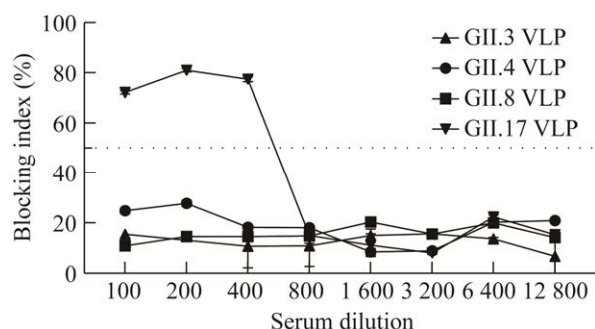


图 5 抗血清的交叉阻断作用

Figure 5 The cross-blocking effect of antiserum.

可变的抗原表位 A/B/C/D, 这可能是不同基因型间交叉反应弱或者不存在交叉反应的原因^[16]。基于 HBGA 的阻断 ELISA 已被广泛用作替代中和试验, 以评估疫苗诱发的抗血清或单克隆抗体的保护潜力。阻断表位的突变可能导致病毒从群体免疫中逃逸, 进而导致突变体的出现。本研究结果显示 GII.17 型抗血清不具备广谱性且仅能诱导机体产生相应型别的阻断抗体, 缺乏跨基因型阻断活性。这是由于 GII.17 正在流行株 GII.4 抗体表位上进化, 其衣壳序列的变化导致阻断抗体结合活性丧失, 特别是在残基 393–396 (表位 D) 处^[31], 表位 D 既是被阻断的单抗表位, 又是配体结合的调节因子, 虽然不是碳水化合物结合口袋的一部分, 但表位 D 残基调节着不同 HBGA 的亲和力^[23,32]。这些发现表明, 除 GII.4 以外的诺如病毒 GII 基因群也能够进行划时代的进化和抗原漂移, 从而增强其大流行潜力。虽然 NoV 的遗传多样性和高抗原进化率使得疫苗的研发十分困难, 但目前一些 NoV VLP 疫苗已进入临床研究阶段。某公司研制的二价 GI.1/GII.4 VLP 疫苗现已进入 II 期临床阶段, 该疫苗具有良好的安全性和免疫原性并可诱导产生针对新基因型的异源交叉保护^[33]。Malm 等利用多价 NoV VLP 同时免疫小鼠^[34], 并对免疫后的多价血清进行系统表征时发现, 多抗原联合免疫可诱导更强烈的保护性免疫应答, 该结果可为制备新型有效 NoV 广谱疫苗、防治 NoV 新毒株的流行和暴发提供理论依据。此外, 在 Sf9 细胞及其他真核细胞中表达 NoV 衣壳蛋白会导致形成 2 种大小的 VLP^[35], 其中较小的 VLP 是全长衣壳蛋白的降解或切割产物, 具有与全长主要衣壳蛋白产生的 VLP 相似的免疫原性。

NoV VLP 疫苗开发的一个重要问题是 NoV 的抗原多样性和主要流行株 GII.4 的进化, 因此可能需要每隔几年重新配制一次 NoV VLP 疫

苗用以预防多种 NoV 变异, 否则可能会诱导交叉阻断表位产生广泛阻断抗体。近期 GII.17 型突变株的出现预示未来 NoV 暴发可能来源于疫苗开发目标外基因型, 其出现和传播可能对全球占主导地位的 GII.4 NoV 候选疫苗的功效构成挑战。从多年的 GII.4 大流行中我们了解到, 具有广泛配体结合模式的病毒会因群体免疫而经历划时代的进化, 这是一种潜在的公共卫生威胁, 持续监测人类 NoV 的流行病学对于进一步了解 NoV 的演变及制定 NoV 疫苗的未来战略非常重要。有证据表明, 多价 VLP 免疫抗血清可检测到有效且持久的阻断抗体反应, 但单价免疫抗血清无此现象^[36]。此外, 在小鼠中接种基于 VLP 的多价 NoV 疫苗可以诱导针对疫苗组合中未包含的其他 NoV 异型基因型的免疫反应^[37], 体现了研发广谱疫苗的重要性, 但这不应局限于增加抗原型别, 深入研究抗原交叉反应性并探究阻断抗体表位的变化可能是未来开发广谱性疫苗的趋势。综上所述, 本研究将为解析 GII.17 的流行机制及开发新型有效的广谱疫苗提供重要参考。

REFERENCES

- [1] LUCERO Y, MATSON DO, ASHKENAZI S, GEORGE S, O'RYAN M. Norovirus: facts and reflections from past, present, and future[J]. *Viruses*, 2021, 13(12): 2399.
- [2] ESPOSITO S, PRINCIPI N. Norovirus vaccine: priorities for future research and development[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 1383.
- [3] CATES JE, VINJÉ J, PARASHAR U, HALL AJ. Recent advances in human norovirus research and implications for candidate vaccines[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2020, 19(6): 539-548.
- [4] MORILLO SG, LUCHS A, CILLI A, RIBEIRO CD, DE CÁSSIA COMPAGNOLI CARMONA R, DO CARMO SAMPAIO TAVARES TIMENETSKY M. Norovirus GII.Pe genotype: tracking a foodborne outbreak on a cruise ship through molecular epidemiology, Brazil, 2014[J]. *Food and Environmental Virology*, 2017, 9(2): 142-148.

- [5] 陈水叶, 宋武慧, 易志刚. 人类诺如病毒反向遗传体系的构建与验证[J]. 微生物与感染, 2021, 16(2): 71-78.
CHEN SY, SONG WH, YI ZG. Construction and validation of human norovirus infectious clones[J]. Journal of Microbes and Infections, 2021, 16(2): 71-78 (in Chinese).
- [6] ZHAO B, HU L, SONG Y, PATIL K, RAMANI S, ATMAR RL, ESTES MK, PRASAD BVV. Norovirus protease structure and antivirals development[J]. Viruses, 2021, 13(10): 2069.
- [7] TAN M, HEGDE RS, JIANG X. The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors[J]. Journal of Virology, 2004, 78(12): 6233-6242.
- [8] DÜLFER J, YAN H, BRODMERKEL MN, CREUTZNACHER R, MALLAGARAY A, PETERS T, CALEMAN C, MARKLUND EG, UETRECHT C. Glycan-induced protein dynamics in human Norovirus P dimers depend on virus strain and deamidation status[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2021, 26(8): 2125.
- [9] LIAO YY, WANG LP, HONG XJ, GAO JS, ZUO YT, LIANG YH, JIANG YT, ZHANG JM, WU AW, XUE L, KOU XX. The VP2 protein exhibits cross-interaction to the VP1 protein in norovirus GII.17[J]. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 2022, 100: 105265.
- [10] CHHABRA P, de GRAAF M, PARRA GI, CHAN MCW, GREEN K, MARTELLA V, WANG QH, WHITE PA, KATAYAMA K, VENNEMA H, KOOPMANS MPG, VINJÉ J. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes[J]. The Journal of General Virology, 2019, 100(10): 1393-1406.
- [11] TENGE VR, HU LY, PRASAD BVV, LARSON G, ATMAR RL, ESTES MK, RAMANI S. Glycan recognition in human Norovirus infections[J]. Viruses, 2021, 13(10): 2066.
- [12] TARRIS G, ESTIENNEY M, DAVAL-FRÉROT P, LARIOTTE AC, AUBIGNAT D, SÉ K, MICHIELS C, MARTIN L, de ROUGEMONT A, BELLIO G. Intestinal Norovirus binding patterns in nonsecretor individuals[J]. Journal of Virology, 2022, 96(19): e0086522.
- [13] XUE L, CAI W, WU Q, ZHANG J, GUO W. Direct sequencing and analysis of the genomes of newly emerging GII.17 norovirus strains in South China[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 120(4): 1130-1135.
- [14] XUE L, CAI WC, GAO JS, ZHANG L, DONG RM, LI YL, WU HM, CHEN MT, ZHANG JM, WANG J, WU QP. 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(1): 696.
- [15] 蔡淑珍, 李贻静, 薛亮, 高珺珊, 蔡伟程, 徐明芳, 吴清平, 张菊梅. 我国贝类中人源诺如病毒检出状况的荟萃分析[J]. 渔业科学进展, 2022. DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.
CAI SZ, LI YJ, XUE L, GAO JS, CAI WC, XU MF, WU QP, ZHANG JM. Detection of human noroviruses in shellfish in China: a meta-analysis[J]. Progress in Fishery Sciences, 2022. DOI: 10.19663/j.issn2095-9869 (in Chinese).
- [16] GAO JS, ZUO YT, XUE L, WANG LP, LIANG YH, JIANG YT, CAI WC, MENG LB, ZHANG JM, YE QH, WU S, GU QH, LEI T, WU QP. Antigenic diversity of human Norovirus capsid proteins based on the cross-reactivities of their antisera[J]. Pathogens (Basel, Switzerland), 2021, 10(8): 986.
- [17] ZUO YT, XUE L, GAO JS, LIAO YY, LIANG YH, JIANG YT, CAI WC, QIN ZW, YANG JL, ZHANG JM, WANG J, CHEN MT, DING Y, WU QP. Evolutionary mechanism of immunological cross-reactivity between different GII.17 variants[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 653719.
- [18] 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 HBGAs 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, LYU 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).
- [19] 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.
- [20] CHEN C, WU B, ZHANG H, LI KF, LIU R, WANG HL, YAN JB. Molecular evolution of GII.P17-GII.17 norovirus associated with sporadic acute gastroenteritis cases during 2013–2018 in Zhoushan Islands, China[J]. Virus Genes, 2020, 56(3): 279-287.
- [21] MATSUSHIMA Y, ISHIKAWA M, SHIMIZU T, KOMANE A, KASUO S, SHINOHARA M, NAGASAWA K, KIMURA H, RYO A, OKABE N, HAGA K, DOAN YH, KATAYAMA K, SHIMIZU H. Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal

- disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region[J]. *European Communicable Disease Bulletin*, 2015, 20(26): 21173.
- [22] DAI YC, ZHANG XF, XIA M, TAN M, QUIGLEY C, LEI W, FANG H, ZHONG WM, LEE B, PANG XL, NIE J, JIANG X. Antigenic relatedness of Norovirus GII.4 variants determined by human challenge sera[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124945.
- [23] de ROUGEMONT A, RUVOEN-CLOUET N, SIMON B, ESTIENNEY M, ELIE-CAILLE C, AHO S, POTHIER P, LE PENDU J, BOIREAU W, BELLIOU G. Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(9): 4057-4070.
- [24] HUANG PW, FARKAS T, ZHONG WM, TAN M, THORNTON S, MORROW AL, JIANG X. Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(11): 6714-6722.
- [25] ZHANG XF, HUANG Q, LONG Y, JIANG X, ZHANG T, TAN M, ZHANG QL, HUANG ZY, LI YH, DING YQ, HU GF, TANG SX, DAI YC. An outbreak caused by GII.17 norovirus with a wide spectrum of HBGA-associated susceptibility[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 17687.
- [26] ATMAR RL, BERNSTEIN DI, HARRO CD, AL-IBRAHIM MS, CHEN WH, FERREIRA J, ESTES MK, GRAHAM DY, OPEKUN AR, RICHARDSON C, MENDELMAN PM. Norovirus vaccine against experimental human Norwalk Virus illness[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2011, 365(23): 2178-2187.
- [27] ARTMAN C, IDEGWU N, BRUMFIELD KD, LAI K, HAUTA S, FALZARANO D, PARREÑO V, YUAN LJ, GEYER JD, GOEPP JG. Feasibility of polyclonal avian immunoglobulins (IgY) as prophylaxis against human Norovirus infection[J]. *Viruses*, 2022, 14(11): 2371.
- [28] DU JL, GU Q, LIU Y, LI QM, GUO T, LIU YY. The endemic GII.4 norovirus-like-particle induced-antibody lacks of cross-reactivity against the epidemic GII.17 strain[J]. *Journal of Medical Virology*, 2021, 93(6): 3974-3979.
- [29] CUBILLOS-ZAPATA C, ANGULO I, ALMANZA H, BORREGO B, ZAMORA-CEBALLOS M, CASTÓN JR, MENA I, BLANCO E, BÁRCENA J. Precise location of linear epitopes on the capsid surface of feline calicivirus recognized by neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies[J]. *Veterinary Research*, 2020, 51(1): 59.
- [30] FU J, AI J, JIN M, JIANG C, ZHANG J, SHI C, LIN Q, YUAN Z, QI X, BAO C, TANG F, ZHU Y. Emergence of a new GII.17 norovirus variant in patients with acute gastroenteritis in Jiangsu, China, September 2014 to March 2015[J]. *European Communicable Disease Bulletin*, 2015, 20(24): 21157.
- [31] LINDESMITH LC, KOCHER JF, DONALDSON EF, DEBBINK K, MALLORY ML, SWANN EW, BREWER-JENSEN PD, BARIC RS. Emergence of novel human Norovirus GII.17 strains correlates with changes in blockade antibody epitopes[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2017, 216(10): 1227-1234.
- [32] LINDESMITH LC, DONALDSON EF, LOBUE AD, CANNON JL, ZHENG DP, VINJE J, BARIC RS. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations[J]. *PLoS Medicine*, 2008, 5(2): e31.
- [33] TAN M. Norovirus vaccines: current clinical development and challenges[J]. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 2021, 10(12): 1641.
- [34] MALM M, VESIKARI T, BLAZEVIĆ V. Simultaneous immunization with multivalent Norovirus VLPs induces better protective immune responses to Norovirus than sequential immunization[J]. *Viruses*, 2019, 11(11): 1018.
- [35] HUO YQ, WAN X, WANG ZJ, MENG SL, SHEN S. Production of Norovirus VLPs to size homogeneity[J]. *Virus Research*, 2015, 204: 1-5.
- [36] HOU WL, LV LH, WANG YH, XING M, GUO YY, XIE D, WEI X, ZHANG XY, LIU H, REN JL, ZHOU DM. 6-valent virus-like particle-based vaccine induced potent and sustained immunity against noroviruses in mice[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 906275.
- [37] LOBUE AD, LINDESMITH L, YOUNT B, HARRINGTON PR, THOMPSON JM, JOHNSTON RE, MOE CL, BARIC RS. Multivalent norovirus vaccines induce strong mucosal and systemic blocking antibodies against multiple strains[J]. *Vaccine*, 2006, 24(24): 5220-5234.