

# 我国食源性诺如病毒 GII.2[P2]型毒株基因组结构与衣壳蛋白功能研究

梁燕惠<sup>1,2</sup>, 高珺珊<sup>2</sup>, 薛亮<sup>2\*</sup>, 王林平<sup>2</sup>, 孟洛冰<sup>2</sup>, 蔡伟程<sup>2</sup>, 李贻静<sup>2</sup>, 张菊梅<sup>2</sup>, 王涓<sup>2</sup>, 陈谋通<sup>2</sup>, 叶青华<sup>2</sup>, 吴诗<sup>2</sup>, 刘细霞<sup>1\*</sup>, 吴清平<sup>2\*</sup>

(1. 湖北师范大学, 生命科学学院食用野生植物保育与利用湖北省重点实验室, 湖北黄石 435002)

(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)

**摘要:** 食源性诺如病毒 (Norovirus) 是引起全球食品安全事件的主要微生物病原, 具有丰富的遗传多样性, 基因型较复杂, 近年来 GII.2 逐渐成为我国主要流行基因型之一。为了解食源性诺如病毒 GII.2 型变异特点, 该研究以 2015 年在广州地区检出的 GII.2[P2] 型 GZ2015-L335 毒株为对象, 对其基因组结构及衣壳蛋白功能进行了系统表征。该毒株基因全长为 7496 bp, 在线基因分型结果表明其为 GII.2[P2] 基因型。通过克隆其衣壳蛋白 VP1 基因, 借助杆状病毒表达系统获取重组 VP1 蛋白, 并采用氯化铯密度梯度离心法进行纯化。SDS-PAGE 和 Western blot 实验结果表明重组 VP1 蛋白分子量约为 58 ku; 透射电镜结果显示该蛋白可自组装形成直径约为 30 nm 的病毒样颗粒 (Virus-like Particle, VLP); ELISA 结果显示该 VLP 与抗 GII.2[P] 衣壳 P 颗粒血清具有较高结合活性。此外, 受体结合实验证实该 VLP 与 A/B/O 等分泌型及非分泌型唾液呈现出广泛的结合作用。该研究对 GII.2[P2] 型 GZ2015-L335 毒株基因组结构进行了系统分析, 成功制备并表征了其病毒样颗粒, 结果将为食源性诺如病毒的高效抗体研制及新型检测技术研发提供支撑。

**关键词:** 食源性诺如病毒; GII.2[P2]; 基因组结构; 病毒样颗粒; 受体结合功能

文章编号: 1673-9078(2022)12-169-175

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.12.0146

## Genome Structure and Capsid Protein Function of the Foodborne Norovirus GII.2[P2] Strain in China

LIANG Yanhui<sup>1,2</sup>, GAO Junshan<sup>2</sup>, XUE Liang<sup>2\*</sup>, WANG Linping<sup>2</sup>, MENG Luobing<sup>2</sup>, CAI Weicheng<sup>2</sup>, LI Yijing<sup>2</sup>, ZHANG Jumei<sup>2</sup>, WANG Juan<sup>2</sup>, CHEN Moutong<sup>2</sup>, YE Qinghua<sup>2</sup>, WU Shi<sup>2</sup>, LIU Xixia<sup>1\*</sup>, WU Qingping<sup>2\*</sup>

(1. Hubei Key Laboratory of Edible Wild Plants Conservation and Utilization, Hubei Normal University, Huangshi 435002, China) (2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Laboratory of Agricultural Microbiomics and Precision Application, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510070, China)

**Abstract:** Foodborne norovirus is the leading microbial pathogens that causes food safety incidents worldwide and has abundant genetic diversity. In this study, the genome structure and capsid protein function of the GII.2[P2] strain GZ2015-L335, which was detected in Guangzhou in 2015, were systematically characterized. The genome length of the strain was 7496 bp, and the online genotyping result showed that it was the GII.2[P2] genotype. The capsid protein VP1 gene was cloned, and the recombinant VP1 protein was expressed using the baculovirus expression system. The recombinant VP1 protein was purified by cesium chloride density gradient centrifugation. SDS-PAGE and Western blot results showed that the molecular weight of the recombinant VP1 protein was approximately 58 ku; transmission electron microscopy results showed that the protein could self-assemble to form virus-like particles (VLP) with a diameter of approximately 30 nm; ELISA results showed that the VLP had high binding activity with anti-GII.2[P] capsid P particle serum. In addition, receptor binding experiments confirmed that the VLP showed wide binding activity with secretory and non-secretory saliva. This study systematically analyzed the genome structure of the GII.2[P2] strain GZ2015-L335, successfully prepared and characterized its virus-like particles, which will provide support for the efficient antibody development and new detection technology development of foodborne norovirus.

梁燕惠, 高珺珊, 薛亮, 等. 我国食源性诺如病毒 GII.2[P2]型毒株基因组结构与衣壳蛋白功能研究[J]. 现代食品科技, 2022, 38(12): 169-175

LIANG Yanhui, GAO Junshan, XUE Liang, et al. Genome structure and capsid protein function of the foodborne norovirus GII.2[P2] Strain in China [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(12): 169-175

收稿日期: 2022-02-14

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1602500); 国家自然科学基金项目 (31872912); 广东省自然科学基金杰出青年基金 (2019B151502065); 广东省重点领域研发计划 (2019B020209001)

作者简介: 梁燕惠 (1997-) 女, 硕士研究生, 研究方向: 食源性病毒进化机制, E-mail: liangyh77@126.com; 共同第一作者: 高珺珊 (1990-) 女, 硕士研究生, 助理研究员, 研究方向: 食源性病毒检测方法, E-mail: gaojs1011@qq.com

通讯作者: 薛亮 (1982-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食源性病毒危害进化机制与防控关键技术, E-mail: xueliang@gdim.cn; 共同通讯作者: 刘细霞 (1983-) 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: liuxixia1@163.com; 吴清平 (1962-) 男, 博士, 研究员, 中国工程院院士, 研究方向: 微生物安全监测与控制, E-mail: wuqp203@163.com

diversity. In recent years, GII.2 has gradually become one of the main prevalent genotypes in China. In order to understand the variation characteristics of this food-borne norovirus GII.2, the GZ2015-L335 strain of GII.2[p2] isolated in Guangzhou in 2015 was used as the research objective, and the genome structure and capsid protein function of this strain were characterized. The full length of the gene of this strain was 7 496 bp. The results of online genotyping showed that it was GII.2[P2] genotype. The recombinant capsid protein VP1 was obtained by cloning the capsid protein VP1 gene and using the recombinant baculovirus expression system, then purified by cesium chloride density gradient centrifugation. The results of SDS-PAGE and Western blot showed that the molecular weight of the recombinant protein VP1 was about 58 ku. The transmission electron microscopy examinations showed that the VP1 could self-assemble into virus-like particles (VLP) with a diameter of approximately 30 nm. The results of ELISA showed that the VLP had high binding activity for the serum against GII.2[P2] capsid P particles. In addition, the receptor binding assay showed that the VLP exhibited broad binding affinities to both secretory salivary receptors (including A/B/O) and non-secretory salivary receptors. In summary, this study systematically analyzed the genome structure of the GII.2[P2] strain, and successfully prepared and characterized its virus-like particles. The obtained results would provide support for the development of highly effective antibody and novel detection technology for food-borne norovirus.

**Key words:** foodborne norovirus; GII.2[P2]; genome structure; virus-like particles; receptor binding function

食源性诺如病毒 (Norovirus, NoV) 是导致世界范围内流行性和散发性急性胃肠炎的主要病原<sup>[1]</sup>。NoV 传播途径广, 主要通过粪-口途径传播, 此外, 进食被 NoV 污染的食物是其重要传播途径之一<sup>[2]</sup>。通过食用在源头上被该病原污染的食物, 如海鲜、浆果和沙拉等, 或者在加工过程中被该病原污染的食品都可导致 NoV 感染<sup>[3]</sup>。据估计, 每年约有 21.2 万人因感染 NoV 发病以致死亡, 相关经济损失 600 多亿美元<sup>[4]</sup>。

NoV 属于杯状病毒科, 诺如病毒属, 是一种极易变异且遗传多样性丰富的 RNA 病毒<sup>[5]</sup>。根据主要衣壳蛋白的序列可将其分为 10 个基因群, 其中基因群 GI、GII、GIV、GVIII 和 GIX 均可感染人<sup>[6]</sup>。据统计, 超过 75% 的人类急性胃肠炎病例由 GII 基因群感染所致<sup>[7]</sup>。其中 GII.4 在过去 20 年内流行, 并通过突变和重组不断演化, 进而在 NoV 流行中占据绝对优势地位<sup>[8]</sup>。但近年来, GII.17 等原非流行株开始突然暴发并不断引起食源性疫情<sup>[9-12]</sup>, 尤其 GII.2 更是成为包括我国在内一些国家的主要流行基因型<sup>[13-15]</sup>, 给全球食品安全带来了新威胁。

我国是 NoV 流行的主要地区之一<sup>[16]</sup>, 作者课题组研究表明, 长期以来 NoV 是我国华南地区重要的急性腹泻病原<sup>[17,18]</sup>, 同时在市售贝类、城市水体中均存在普遍的 NoV 污染<sup>[19]</sup>。为深入了解 NoV 流行进化机制以对其进行有效防控, 本研究拟以团队前期获得的 GII.2[P2]型 GZ2015-L335 毒株为对象, 对其基因组结构及衣壳蛋白功能进行分析和研究, 以期对食品中 NoV 快速检测方法建立及疫苗研发提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 毒株和细胞

GII.2[P2]型 GZ2015-L335 毒株来自作者团队前期

广州地区急性腹泻临床样本并已分型鉴定; Sf9 昆虫细胞购自国家细胞资源平台; 大肠杆菌 DH10Bac 和 DH5 $\alpha$  感受态细胞分别购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司和宝日医生物技术(北京)有限公司。

### 1.2 质粒及试剂

GZ2015-L335-ORF2 质粒、载体 pFastBac1、唾液样本收集自广东省科学院微生物研究所 51 名健康志愿者并于前期完成表型鉴定; 抗 GII.2[P]衣壳 P 颗粒血清为实验室前期制备<sup>[20]</sup>; Prime STAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sph* I, 宝日医生物技术(北京)有限公司; Western blot 快速封闭液、杆状病毒载体质粒提取试剂盒和 BeyoECL Plus (超敏 ECL 化学发光试剂盒), 北京碧云天生物公司; 10 $\times$ PBST WB 漂洗液、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranoside, IPTG)、5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷 (X-gal)、四环素、庆大霉素、卡那霉素、氨苄青霉素, 上海生工生物工程股份有限公司; 辣根过氧化物酶 (Horse Radish Peroxidase, HRP) 标记的 Goat Anti Mouse IgG (H+L)、无血清培养基和昆虫细胞转染试剂, 北京义翘神州科技股份有限公司; 猪胃粘蛋白 III 型, 美国 Sigma 公司; DL 5,000 DNA Marker 和 Blue Plus<sup>®</sup> IV Protein Marker (10~180 kDa), 北京全式金生物技术有限公司。

### 1.3 主要仪器设备

Bio-Rad Power Pac 基础电泳仪, 美国伯乐公司; Tanon 凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司; DHP-9272 型电热恒温培养箱, 上海浦东荣丰科学仪器有限公司; GI-54TW 高压灭菌锅, 美国 ZEALWAY; 电子天平, 常熟市双杰测试仪器厂; JY92-IIDN 超声波细胞粉碎机,

宁波新芝生物科技有限公司; BE-9008 微孔板恒温振荡器, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; EPOCH2 酶标仪, 美国 Biotech 公司; HBS-4009 自动洗板机, 南京德铁实验设备有限公司; BECKMAN Avanti J-301 高速冷冻离心机, 美国 Beckman Coulter 有限公司; Hitachi H-7650 透射电子显微镜, 日本 HITACHI。

## 1.4 方法

### 1.4.1 基因序列分析

将毒株 GZ2015-L335 核苷酸序列提交至 GenBank 数据库, 并进行 BLAST 在线比对 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 根据参考毒株对 GZ2015-L335 基因组结构进行分析。同时, 采用在线基因分型工具 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) 进行毒株基因分型。

### 1.4.2 重组 pFastBac-GZ2015-L335 转座质粒的构建

根据 GZ2015-L335 毒株的 ORF2 区域设计特异性扩增引物, 上下游引物分别加上酶切位点 *Bam*H I 和 *Sph* I (下划线部分)。F: 5'-CGGGATCCATGAAGATGGCGTCAATGA-3'; R: 5'-CATGCATGCTTATTGAACCTTCTACGCC-3', 由北京六合华大公司合成。以病毒基因组为模板扩增 ORF2 序列, PCR 反应体系 (50  $\mu$ L): PrimeSTAR Max Premix (2 $\times$ ) 25  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, 上、下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 22  $\mu$ 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 3 个循环, 72  $^{\circ}$ C 5 min。使用 *Bam*H I 和 *Sph* I 分别对扩增产物及 pFastBac 载体进行双酶切, 连接酶切产物后将其转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂布于氨苄青霉素抗性琼脂平板后进行菌落 PCR 筛选, 将阳性克隆送至北京六合华大公司测序。

### 1.4.3 重组 Bacmid-GZ2015-L335 质粒的构建

将测序正确的重组 pFastBac-GZ2015-L335 质粒提取后转化大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞, 涂布于含 X-gal (100  $\mu$ g/mL)、IPTG (40  $\mu$ g/mL)、卡那霉素 (50  $\mu$ g/mL)、四环素 (10  $\mu$ g/mL) 和庆大霉素 (7  $\mu$ g/mL) 的抗性平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养 48 h 后, 挑白色单菌落于 LB 抗性平板上划线, 37  $^{\circ}$ C 过夜培养后, 挑单菌落进行菌落 PCR 验证, 设定野生型杆状病毒为对照组。

### 1.4.4 重组杆状病毒构建和蛋白表达

从 PCR 验证正确的阳性菌株中提取重组 Bacmid-GZ2015-L335 质粒, 按照昆虫细胞转染试剂操作说明, 将重组 Bacmid-GZ2015-L335 质粒转染至 Sf9 昆虫细胞中, 获得 P1 代杆状病毒。将 P1 代杆状病毒接种至 Sf9 细胞中, 获得 P2 代杆状病毒。对病毒进行滴度测定后, 当感染复数 (Multiplicity of Infection) 值

为 0.05~0.1 时, 接种至 Sf9 细胞并于 27  $^{\circ}$ C、150 r/min 条件下表达 48 h 后进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.4.5 超离纯化

收集细胞培养物 7 000 r/min、4  $^{\circ}$ C 离心 10 min, 收集沉淀并用 PBS 重悬, 经超声破碎后, 离心收集上清。上清用 7% (m/V) PEG6000 和 2% (m/V) 的 NaCl 沉降过夜, 次日 10 000 r/min、4  $^{\circ}$ C 离心 30 min, 收集沉淀, 然后加入等体积浓度为 1.4 g/mL 的 CsCl 溶液并重悬于 13.2 mL 的超离管中, 288 000 r/min、8  $^{\circ}$ C 离心 24 h, 收集可见带, PBS 重悬后, 141 000 r/min、8  $^{\circ}$ C 离心 3 h 以去除 CsCl 并收集沉淀。PBS 重悬沉淀即获得 GZ2015-L335 VLP。

### 1.4.6 透射电镜观察

通过紫外分光光度计测定毒株 GZ2015-L335 VLP 蛋白浓度, 经磷钨酸负性染色后, 于 40 000 $\times$ 透射电子显微镜下观察病毒样颗粒的形态及大小。

### 1.4.7 Western blot 鉴定

纯化的 GZ2015-L335 VLP 经 SDS-PAGE 电泳分离后, 将其电转至聚偏二氟乙烯 (Polyvinylidene Fluoride, PVDF) 膜上, 经 Western blot 快速封闭液封闭 15 min 后, 加入 1:3 000 稀释的抗 GII.2[P]衣壳 P 颗粒血清 4  $^{\circ}$ C 过夜孵育, 次日用漂洗液漂洗 3 次, 每次 10 min, 加入 1:3 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h。用洗涤液漂洗 3 次, 条件同上, 最后采用 ECL 化学发光法对 PVDF 膜进行显影。

### 1.4.8 ELISA 鉴定

将 GZ2015-L335 VLP 浓度稀释为 1  $\mu$ g/mL, 4  $^{\circ}$ C 包被过夜。次日用 PBST 洗板 3 次。5% 脱脂奶 37  $^{\circ}$ C 封闭 2 h。PBST 洗板 3 次, 加入 1:10 000 稀释的抗 GII.2[P]衣壳 P 颗粒血清, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h。PBST 洗板 4 次, 将 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 按 1:3 000 稀释并加至板中, 37  $^{\circ}$ C 孵育 0.5 h。PBST 洗 5 次。加入 TMB 37  $^{\circ}$ C 避光孵育 10 min。反应结束后, 加入终止液。酶标仪上测定 OD<sub>450</sub> 值。OD<sub>450</sub> 值 > 0.2 且至少为阴性对照的 2 倍为判为阳性, 同时设置 PBS 为阴性对照。

### 1.4.9 受体结合功能验证

利用 NoV 结合组织血型抗原 (Histo- Blood Groups antigens, HBGAs) 实验评估重组 GZ2015-L335 VLP 与不同血型人唾液 (A、B、O 和非分泌型) 以及猪胃粘蛋白 III 型 (Pig Gastric Mucin Type III, PGM) 的结合情况。将不同血型的唾液样本以 1:1 000 稀释后, 4  $^{\circ}$ C 包被过夜, 5% (m/V) 脱脂奶粉 37  $^{\circ}$ C 封闭 2 h, 随后加入浓度为 1  $\mu$ g/mL 的 GZ2015-L335 VLP, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 加入 1:10 000 稀释的抗 GII.2[P]衣壳 P 颗粒血清, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h。PBST 洗板 4 次, 将 HRP 标记的羊

抗鼠 IgG 按 1:3 000 稀释并加至板中, 37 °C 孵育 0.5 h。PBST 洗板 5 次后, 加入 TMB 37 °C 避光孵育 10 min。反应结束后, 加入终止液。酶标仪上测定 OD<sub>450</sub> 值。设置 PBS 为阴性对照, 以 PGM 包板作为阳性对照。

## 2 结果与讨论

### 2.1 毒株 GZ2015-L335 基因序列分析

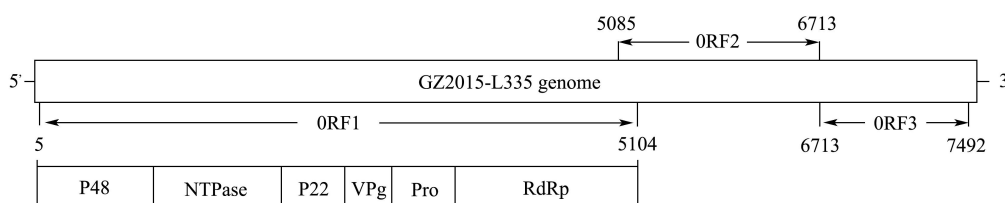


图 1 毒株 GZ2015-L335 基因组结构组成

Fig.1 Genome composition of the norovirus strain GZ2015-L335

### 2.2 重组 pFastBac-GZ2015-L335 转座质粒和重组 Bacmid-GZ2015-L335 质粒的构建及鉴定

将目的片段与表达载体连接后, 转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 感受态细胞中, 利用抗性板筛选后进行测序分析。结果表明插入片段大小与序列均正确, 重组转座质粒 pFastBac-GZ2015-L335 成功构建。接着将 pFastBac-GZ2015-L335 重组质粒转化至大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞, 经抗性平板筛选后, 进行 PCR 鉴定, 结果如图 2。可见扩增产物在约 4 000 bp 处有单一明显条带, 其大小与预期相符, 表明重组 Bacmid-GZ2015-L335 质粒已成功构建。

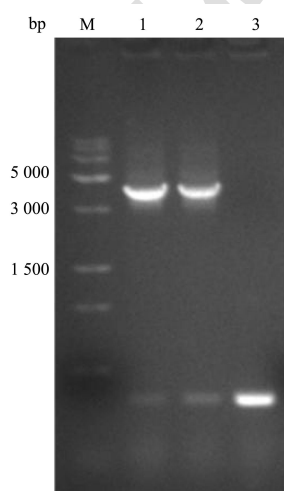


图 2 重组质粒 Bacmid-GZ2015-L335 的菌落 PCR 鉴定

Fig.2 Colony PCR identification of the recombinant plasmid Bacmid-GZ2015-L335

注: M 为 DNA Marker; 1、2 分别为阳性克隆; 3 为野生型杆状病毒 (阴性对照)。

毒株 GZ2015-L335 基因组全长为 7 496 bp (GenBank 登录号为 MK729086), 包括 3 个开放阅读框 (Open Reading Frames, ORFs), 分别位于 5~5 104 bp, 5 085~6 713 bp 和 6 713~7 492 bp 处。其中, ORF1 与 ORF2 存在重叠区域含有 20 bp, 而 ORF2 与 ORF3 重叠一个碱基 A (图 1)。在线分型工具分析结果表明毒株 GZ2015-L335 属于 GII.2[P2]基因型。

### 2.3 毒株 GZ2015-L335 VLP 的表达及纯化

将重组 Bacmid-L335 质粒转染至 Sf9 昆虫细胞中, 获得 P1 代杆状病毒, 将该病毒接种至 Sf9 细胞中, 获得 P2 代杆状病毒。收集 P2 代感染后的细胞, 对重组蛋白提取纯化后, 进行 SDS-PAGE 电泳分析, 由图 3 可见在约 58 ku 处有较为清晰的条带, 其大小与目的蛋白一致, 在略低于目的蛋白下方出现蛋白条带, 可能为 GZ2015-L335 VLP 的 N 端缺失部分氨基酸所致<sup>[21]</sup>。

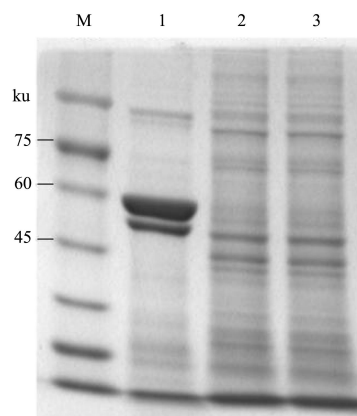


图 3 毒株 GZ2015-L335 VLP 的 SDS-PAGE 鉴定

Fig.3 SDS-PAGE identification of the norovirus strain GZ2015-L335 VLP

注: 1 为 GZ2015-L335 VLP; 2 为未被感染的 Sf9 细胞; 3 为感染野生型杆状病毒的 Sf9 细胞; M 为蛋白 Marker。

### 2.4 毒株 GZ2015-L335 VLP 的透射电镜观察

NoV 病毒样颗粒作为天然病毒的替代品, 具有与天然病毒相似的形态结构和免疫原性, 能够诱导宿主产生较高水平的免疫应答, 被广泛应用于 NoV 疫苗研发和抗体制备<sup>[22]</sup>。本研究中, 通过透射电镜观察发现, 纯化后的 GZ2015-L335 VLP 可以形成直径约为 30 nm

的颗粒，与天然病毒粒子大小相近，表明其可自组装成病毒样颗粒<sup>[23]</sup>。

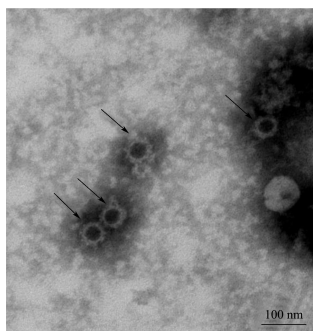


图4 毒株 GZ2015-L335 VLP 的透射电镜观察 (40 000×)

Fig.4 Observation of the GZ2015-L335 VLP by transmission electron microscopy

## 2.5 毒株 GZ2015-L335 VLP 的 Western blot 鉴定

利用 Western blot 对纯化后的 GZ2015-L335 VLP 进行鉴定。结果如图 5，膜上在 58 ku 处有特异性条带，而野生型杆状病毒感染组和正常的 Sf9 细胞对照组都没有出现特异性条带，表明纯化得到的 GZ2015-L335VLP 具有较好的反应原性和特异性。而在目标蛋白下方出现多条条带的原因可能是在制样过程中蛋白质发生了降解所致。

## 2.6 毒株 GZ2015-L335 VLP 的 ELISA 鉴定

采用间接 ELISA 法，以抗 GII.2[P]衣壳 P 颗粒血清为一抗，HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗对纯化后的 VLP 进行鉴定。ELISA 结果见图 6，表明 GZ2015-L335VLP 与抗血清具有较高结合活性。

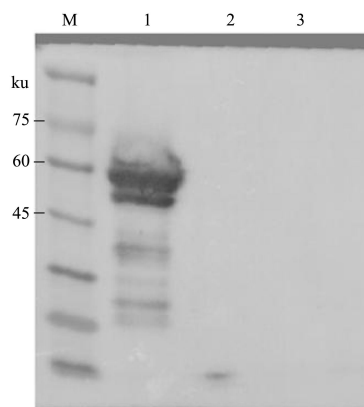


图5 毒株 GZ2015-L335 VLP 的 Western blot 鉴定

Fig.5 Western blot identification of the norovirus strain GZ2015-L335 VLP

注：M 为蛋白 Marker；1 为 GZ2015-L335 VLP；2 为正常的 Sf9 细胞；3 为感染野生型杆状病毒的 Sf9 细胞。

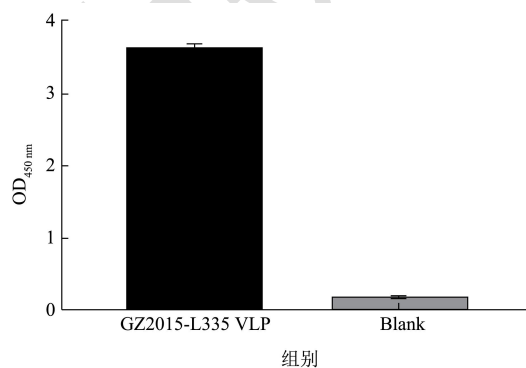


图6 毒株 GZ2015-L335 VLP 的 ELISA 鉴定

Fig.6 ELISA identification of the norovirus strain GZ2015-L335 VLP

## 2.7 毒株 GZ2015-L335 VLP 的受体结合功能验证

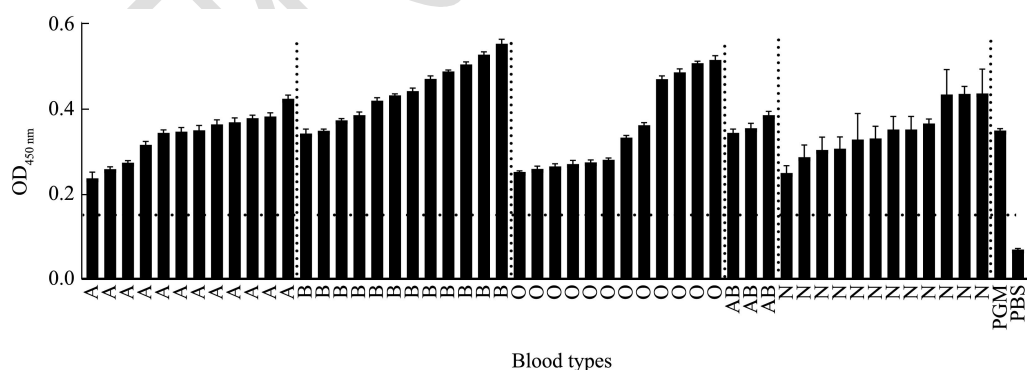


图7 毒株 GZ2015-L335 VLP 的受体结合功能验证

Fig.7 Receptor binding function of the norovirus strain GZ2015-L335 VLP

注：A、B、O、AB 分别为不同分泌型唾液样本；N 为非分泌型唾液样本；PGM 为阳性对照；PBS 为阴性对照。

大量研究表明 HBGAs 为 NoV 的天然受体或协同因子<sup>[24,25]</sup>，能促进病毒感染宿主细胞<sup>[26]</sup>。目前发现大多数 NoV 基因型的受体结合模式相似，即与 A/B/O 分泌型受体结合，而非分泌型受体不结合<sup>[27,28]</sup>。本研究将 39 份分泌型 (A、B、O 和 AB) 和 12 份非分泌型 (N)

唾液样品用于分析 GZ2015-L335 VLP 与 HBGAs 的结合情况。受体结合功能实验结果表明，重组 GZ2015-L335VLP 与 A/B/O 等分泌型及非分泌性唾液受体均呈现广泛的结合作用，表现出广泛的受体结合谱 (图 7)。Michael 等<sup>[29]</sup>通过对比新现株 GII.2[P16]和

祖先株 GII.2[P2] (即雪山病毒) 的进化过程, 发现两者衣壳蛋白序列相似性 >96%, 两种毒株的受体结合谱也相似, 并且体外受体结合阻断实验也显示衣壳蛋白的轻微变异未对抗体中和作用造成影响。因此, NoV 可通过多种机制在人群中持续流行, 除衣壳蛋白变异造成受体结合能力及免疫原性变化外, 基因重组也已成为重要驱动力<sup>[30]</sup>。

### 3 结论

近年来, 食源性 GII.2 型 NoV 逐渐成为中国及其他国家 NoV 暴发流行的主要基因型之一<sup>[31-35]</sup>。系统掌握 GII.2 型 NoV 进化机制是防控该基因型病毒流行的重要基础, 因此本研究以 2015 年在广州地区检出的 GII.2[P2] 型 GZ2015-L335 毒株为对象, 对其基因组结构进行系统分析。此外, 利用昆虫细胞杆状病毒表达系统成功制备 GII.2[P2] 型 VLP, 并对其免疫原性和受体结合功能进行了系统研究。SDS-PAGE 结果表明, 重组 GII.2[P2] 型 VP1 蛋白大小与预期相符。透射电镜结果表明, 该 VP1 蛋白可自组装成 VLP, 其形态大小与天然病毒粒子相似。Western blot 和 ELISA 结果显示, 该 VLP 与抗 GII.2[P] 衣壳 P 颗粒血清具有较高结合活性, 表明其具有良好的反应原性和特异性。此外, 受体结合实验结果显示, 该 VLP 与 A/B/O 等分泌型及非分泌性唾液受体均呈现广泛的结合作用, 表现为人群普遍易感。综上所述, 本实验结果将为食品中 NoV 的高效抗体研制及新型检测技术研发提供支撑, 同时也为进一步揭示病毒的流行机制和监测该毒株的变异特点提供理论数据。

### 参考文献

- [1] Noda M. Current status of norovirus food poisoning related to bivalve mollusk and its control measures [J]. Food Hygiene and Safety Science, 2017, 58(1): 12-25
- [2] Thorne L G, Goodfellow I G. Norovirus gene expression and replication [J]. Journal of General Virology, 2014, 95(2): 278-291
- [3] Hardstaff J L, Clough H E, Lutje V, et al. Foodborne and food-handler norovirus outbreaks: a systematic review [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2018, 15(10): 589-597
- [4] Lopman B, Steele D, Kirkwood C, et al. The vast and varied global burden of norovirus: prospects for prevention and control [J]. PLoS Medicine, 2016, 13(4): e1001999
- [5] Parra G I, Squires R B, Karangwa C K, et al. Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity [J]. PLoS Pathogens, 2017, 13(1): e1006136
- [6] Chhabra P, De Graaf M, Parra GI, et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes [J]. Journal of General Virology, 2020, 101(8): 893-893
- [7] Advisory Committee on Immunization Practices, Centers for Disease Control and Prevention. Immunization of health-care personnel: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP) [J]. MMWR Recomm Rep, 2011, 60(RR-7): 1-45
- [8] Karst S M, Baric R S. What is the reservoir of emergent human norovirus strains? [J]. Journal of Virology, 2015, 89(11): 5756-5759
- [9] Lopes-Joao A, Mesquita J R, De Sousa R, et al. Country-wide surveillance of norovirus outbreaks in the portuguese army, 2015-2017 [J]. Journal of the Royal Army Medical Corps, 2018, 164(6): 419-422
- [10] Giammanco G M, Bonura F, Urone N, et al. Waterborne norovirus outbreak at a seaside resort likely originating from municipal water distribution system failure [J]. Epidemiology and Infection, 2018, 146(7): 879-887
- [11] Ao Y, Xie X, Dong X, et al. Genetic analysis of an emerging GII.P2-GII.2 norovirus associated with a 2016 outbreak of acute gastroenteritis in China [J]. Virologica Sinica, 2019, 34(1): 111-114
- [12] Sakon N, Komano J, Tessmer H, et al. High transmissibility of norovirus among infants and school children during the 2016/17 season in Osaka, Japan [J]. Eurosurveillance, 2018, 23(6): 2-6
- [13] 张萌, 龙遗芳, 郭莉敏, 等. 广东省 2013-2017 年 3 种基因型诺如病毒感染暴发疫情的流行特征 [J]. 中华流行病学杂志, 2018, 39(9): 1210-1215
- [14] Thongprachum A, Okitsu S, Khamrin P, et al. Emergence of norovirus GII.2 and its novel recombination during the gastroenteritis outbreak in Japanese children in mid-2016 [J]. Infection Genetics and Evolution, 2017, 51: 86-88
- [15] Niendorf S, Jacobsen S, Faber M, et al. Steep rise in norovirus cases and emergence of a new recombinant strain GII.P16-GII.2, germany, winter 2016 [J]. Eurosurveillance, 2017, 22(4): 2-5
- [16] Wang L P, Zhou S X, Wang X, et al. Etiological, epidemiological, and clinical features of acute diarrhea in China [J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 2464
- [17] Xue L, Wu Q, Dong R, et al. Genetic analysis of noroviruses associated with sporadic gastroenteritis during winter in Guangzhou, China [J]. Foodborne Pathogens and Disease,

- 2013, 10(10): 888-895
- [18] Xue L, Dong R, Wu Q, et al. Molecular epidemiology of noroviruses associated with sporadic gastroenteritis in Guangzhou, China, 2013-2015 [J]. Archives of Virology, 2016, 161(5): 1377-1384
- [19] 杨家乐,薛亮,蔡伟程,等.2020-2021年广州市售牡蛎中 GII 型诺如病毒污染情况调查[J].食品工业科技,2021,43(10): 271-278
- [20] Gao J, Zuo Y, Xue L, et al. Antigenic diversity of human norovirus capsid proteins based on the cross-reactivities of their antisera [J]. Pathogens, 2021, 10(8): 986
- [21] Koho T, Huhti L, Blazevic V, et al. Production and characterization of virus-like particles and the P domain protein of GII.4 norovirus [J]. Journal of Virological Methods, 2012, 179(1): 1-7
- [22] Zhang H N, Liu D L, Zhang Z L, et al. Surveillance of human norovirus in oysters collected from production area in Shandong Province, China during 2017-2018 [J]. Food Control, 2021, 121(8): 107649
- [23] Herbst-Kralovetz M, Mason H S, Chen Q. Norwalk virus-like particles as vaccines [J]. Expert Review of Vaccines, 2010, 9(3): 299-307
- [24] Tan M, Jiang X. The P domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors [J]. Journal of Virology, 2005, 79(22): 14017-14030
- [25] Hutson A M, Atmar R L, Marcus D M, et al. Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to H histo-blood group antigens [J]. Journal of Virology, 2003, 77(1): 405-415
- [26] 张绪富,戴迎春,夏仁飞,等.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
- [27] Dai Y, Zhang X, Xia M, et al. Antigenic relatedness of norovirus GII.4 variants determined by human challenge sera [J]. Plos One, 2015, 10(4): e0124945
- [28] Gao J, Xue L, Liang Y, et al. Receptor profile and immunogenicity of the non-epidemic norovirus GII.8 variant [J]. Virus Research, 2021, 306: 198603
- [29] Mallory M L, Lindesmith L C, Brewer-Jensen P D, et al. Bile facilitates human norovirus interactions with diverse histoblood group antigens, compensating for capsid microvariation observed in 2016-2017 GII.2 strains [J]. Viruses-Basel, 2020, 12(9): 989
- [30] Ruis C, Lindesmith L C, Mallory M L, et al. Preadaptation of pandemic GII.4 noroviruses in unsampled virus reservoirs years before emergence [J]. Virus Evolution, 2020, 6(2): veaa067
- [31] Guo X, Kan Z, Liu B, et al. A foodborne acute gastroenteritis outbreak caused by GII.P16-GII.2 norovirus in a boarding high school, Beijing, China: a case-control study [J]. BMC Research Notes, 2018, 11(1): 439-439
- [32] Medici C, Tummolo F, Martella V, et al. Emergence of novel recombinant GII.P16\_GII.2 and GII.P16\_GII.4 Sydney 2012 norovirus strains in Italy, winter 2016/2017 [J]. New Microbiologica, 2018, 41(1): 71-72
- [33] Thanusuwannasak T, Puenpa J, Chuchaona W, et al. Emergence of multiple norovirus strains in Thailand, 2015-2017 [J]. Infection Genetics and Evolution, 2018, 61: 108-112
- [34] Nagasawa K, Matsushima Y, Motoya T, et al. Phylogeny and immunoreactivity of norovirus GII.P16-GII.2, Japan, winter 2016-17 [J]. Emerging Infectious Diseases, 2018, 24(1): 144-148
- [35] Bidalot M, Theyry L, Kaplon J, et al. Emergence of new recombinant noroviruses GII.p16-GII.4 and GII.p16-GII.2, France, winter 2016 to 2017 [J]. Eurosurveillance, 2017, 22(15): 7-11