



# 在 flashBAC 杆状病毒表达系统中制备人 GII.4 型诺如病毒样颗粒

刘志鹏<sup>1</sup>, 肖锦宁<sup>2</sup>, 段良伟<sup>1</sup>, 王琼梓<sup>1</sup>, 王向鹏<sup>1\*</sup>

1 新乡医学院 医学技术学院, 河南省免疫与靶向药物重点实验室, 河南 新乡 453003

2 新乡医学院第三附属医院检验科, 河南 新乡 453003

刘志鹏, 肖锦宁, 段良伟, 王琼梓, 王向鹏. 在 flashBAC 杆状病毒表达系统中制备人 GII.4 型诺如病毒样颗粒[J]. 微生物学报, 2024, 64(10): 3798-3808.

LIU Zhipeng, XIAO Jinning, DUAN Liangwei, WANG Qiongzhi, WANG Xiangpeng. Preparation of virus-like particles of human GII.4 norovirus in the flashBAC baculovirus expression system[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(10): 3798-3808.

**摘要:** 【目的】人诺如病毒(human norovirus, HuNoV)是全球范围内引起人急性胃肠炎的主要病原之一, 目前尚无有效的疫苗对该病毒进行预防。本研究旨在利用 flashBAC 杆状病毒表达系统, 制备 HuNoV 病毒样颗粒(virus-like particles, VLP), 为研发 HuNoV 疫苗奠定基础。【方法】将 GII.4 型 HuNoV 的 VP1 蛋白全长基因序列进行密码子优化后合成, 克隆至杆状病毒 pBacPAK9 转移载体, 获得 pBacPAK9-8his-VP1 重组质粒。酶切、测序鉴定正确后将重组质粒与线性 baculovirus plasmid (Bacmid)共转染 SF9 细胞, 获得含有 VP1 基因的重组杆状病毒。重组杆状病毒感染 Hi-Five (HF) 细胞进行表达, 利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)和 Western blotting 分析 VP1 蛋白的表达。用镍柱亲和层析方法纯化 VP1 蛋白; 对纯化后的 VP1 蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测。使用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)对纯化的 VP1 蛋白进行纯度鉴定。利用透射电镜观察 VLP。【结果】构建了 pBacPAK9-8his-VP1 重组质粒, VP1 蛋白在 HF 细胞中主要在细胞质内表达, 分子量约为 58 kDa。HPLC 结果显示 VP1 蛋白纯度大于 99%, 透射电镜可以观察到形状规则、大小均一、直径约为 30–40 nm 的 VLP。【结论】利用杆状病毒表达系统制备了 GII.4 型 HuNoV 的 VLP, 为 HuNoV 疫苗的研发奠定了基础。

**关键词:** 人诺如病毒; VP1 蛋白; 杆状病毒表达系统; 病毒样颗粒

资助项目: 河南省科技攻关项目(232102311062, 222102310688)

This work was supported by the Key Scientific and Technological Project of Henan Province (232102311062, 222102310688).

\*Corresponding author. E-mail: wangxiangpeng2003@126.com

Received: 2024-03-29; Accepted: 2024-06-17; Published online: 2024-06-21

# Preparation of virus-like particles of human GII.4 norovirus in the flashBAC baculovirus expression system

LIU Zhipeng<sup>1</sup>, XIAO Jinning<sup>2</sup>, DUAN Liangwei<sup>1</sup>, WANG Qiongzhi<sup>1</sup>, WANG Xiangpeng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Henan Key Laboratory of Immunology and Targeted Drugs, School of Medical Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China

<sup>2</sup> Department of Clinical Laboratory, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China

**Abstract:** [Objective] Human norovirus (HuNoV) is one of the most common pathogens causing acute gastroenteritis in humans worldwide. Currently, there are no approved vaccines to prevent this disease. This study aimed to prepare virus-like particles (VLPs) of HuNoV in the flashBAC baculovirus expression system, laying a foundation for the development of vaccines against HuNoV. [Methods] After codon optimization, the full-length gene sequence of the VP1 protein of HuNoV GII.4 was synthesized and cloned into the baculovirus pBacPAK9 transfer vector to obtain the recombinant plasmid pBacPAK9-8his-VP1. After enzyme digestion and sequencing, the recombinant plasmid was co-transfected with the linear baculovirus plasmid (Bacmid) into SF9 cells to obtain a recombinant baculovirus carrying the VP1 gene. Hi-Five (HF) cells were infected by the recombinant baculovirus for protein expression, and the expression of VP1 was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. VP1 was purified by Ni-NTA affinity chromatography and identified by SDS-PAGE and Western blotting. The purity of VP1 was examined by high performance liquid chromatography (HPLC). The VLPs were observed by transmission electron microscopy. [Results] A transfer plasmid pBacPAK9-8his-VP1 was constructed, and the VP1 protein, with a molecular weight of approximately 58 kDa, was mainly expressed in the cytoplasm of HF cells. The HPLC results showed that the purity of VP1 was over 99%. The VLPs with a regular shape, uniform sizes, and diameters of 30–40 nm were observed by transmission electron microscopy. [Conclusion] The VLPs of HuNoV GII.4 were prepared with a baculovirus expression system, laying a foundation for the development of HuNoV vaccines.

**Keywords:** human norovirus; VP1 protein; baculovirus expression system; virus-like particles

人诺如病毒(human norovirus, HuNoV)是全球范围内引起人急性胃肠炎暴发流行的主要病原之一, 该病毒主要通过污染的水源或食物经粪-口途径传播, 也可以通过呕吐物的气溶胶进行传播<sup>[1]</sup>。该病毒传染性强, 人群普遍易感, 患者临床症状主要表现为恶心、呕吐、腹痛、腹泻、头痛、发热和肌肉痛等症状, 多数感染者呈自限

性, 预后较好<sup>[2]</sup>。该病毒对儿童威胁大, 5岁以下儿童感染后有时会出现电解质紊乱、脱水、酸中毒和惊厥等症状, 甚至死亡<sup>[3-4]</sup>。目前无获批疫苗和特效的疗法用于预防和治疗 HuNoV 感染引起的疾病, 该病毒引发疾病负担重, 在人口聚集的幼儿园和学校等场所容易引起暴发流行, 从而成为突发公共卫生问题<sup>[5]</sup>。HuNoV 分类属于

杯状病毒科诺如病毒属,基因组为单股正链RNA,病毒体呈二十面体立体对称的球形颗粒,无包膜。病毒基因全长约为7.5 kb,由3个开放阅读框(open reading frames, ORF)组成,分别是ORF1、ORF2和ORF3<sup>[6]</sup>。ORF1编码病毒的6个非结构蛋白,主要功能是参与病毒的复制。ORF2编码病毒的主要衣壳蛋白VP1,ORF3编码病毒的次要衣壳蛋白VP2。病毒的二十面体衣壳由90个VP1蛋白二聚体和少量的VP2蛋白组成,病毒感染机体后,VP1蛋白可以引起体液免疫,是疫苗研发的主要抗原<sup>[7-8]</sup>。VP1蛋白由外壳结构域(S区)和突出结构域(P区)组成,S区在不同毒株之间高度保守,P区不同毒株之间变异较大,病毒的保护性抗原表位主要在P区<sup>[9-11]</sup>。根据病毒RNA聚合酶和衣壳蛋白基因序列的不同,HuNoV被分为5个基因群,分别是GI、GII、GIII、GIV和GV群,同一基因群可进一步再分为不同基因型,其中GII.4型毒株是全球范围内主要流行的毒株<sup>[12-13]</sup>。

病毒样颗粒(virus-like particles, VLP)是由病毒的一个或多个结构蛋白组成的与天然病毒在形态和结构相似的空心蛋白颗粒。VLP不含病毒的遗传物质,不能自主复制,因此不具有致病性和传染性,VLP能诱导机体产生免疫应答反应,所以基于VLP的亚单位疫苗受到广泛的关注。研究表明HuNoV的VP1蛋白可以自组装成VLP<sup>[14-15]</sup>,由于HuNoV尚不能通过细胞进行培养,所以HuNoV疫苗的研发主要集中在重组蛋白疫苗。FlashBAC杆状病毒表达系统属于真核蛋白表达系统,该系统缺失了杆状病毒基因组DNA必需基因的一部分,用人工合成的基因(bacterial artificial chromosome, BAC)替代多角体编码区,改造后的杆状病毒能在大肠杆菌中复制,不能在昆虫细胞中复制。当与携带目的基因的转移载体共转染昆虫细胞后,通过同源重组重

新获得必需基因片段,并将目的基因转移到杆状病毒基因组中,只有发生同源重组的病毒才能在昆虫细胞中复制,从而实现在昆虫细胞中一步法生产重组病毒,该系统表达外源蛋白具有省时省力和蛋白表达量高等特点。本研究拟通过应用flashBAC杆状病毒表达系统表达GII.4型HuNoV的VP1蛋白制备VLP,为HuNoV亚单位疫苗的研发奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

杆状病毒转移载体pBacPAK9、SF9昆虫细胞、Hi-Five (HF)昆虫细胞、杆状病毒质粒baculovirus plasmid (Bacmid)和大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞由本实验室保存或制备;GII.4型HuNoV VP1蛋白(PDB登录号为7K6V\_AA)基因序列根据SF9细胞密码子偏好性进行优化,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成并连接至pUC57载体;限制性内切酶、PrimeSTAR Max Premix (2 $\times$ ), TaKaRa公司;闪电克隆酶、GII.4型HuNoV兔源多克隆性抗体、HRP标记山羊抗兔抗体,北京博奥龙免疫技术有限公司;昆虫细胞IB907、IB908无血清培养基,浙江壹生科生物技术有限公司;梭华-Sofast转染试剂,厦门太阳马生物工程有限公司;镍柱填料,博格隆(上海)生物技术有限公司。

### 1.2 主要仪器

PCR仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;全自动化蛋白纯化仪,苏州赛普生物科技股份有限公司;高效液相色谱仪,岛津公司;透射电子显微镜, HITACHI公司。

### 1.3 重组质粒pBacPAK9-8his-VP1的构建和鉴定

以合成的pUC57-VP1质粒为模板,PCR扩增N端带有8个组氨酸标签的VP1基因片段,

PCR 正向引物 F 序列: 5'-GAATTCGAGCTCGGTACC (载体同源臂序列) ATGCATCACCA CCATCACCATCATCAC (His 标签序列) GAGA ATTTGTATTTCCAAGGC-3', 反向引物 R 序列: 5'-GGCCGCCCTGCAGGCCTCGAG (载体同源臂序列) TCATAGTGCCCTCCTCCGTC-3'。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 模板(200 ng) 1  $\mu$ L, 引物 F 和 R (10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, PrimeSTAR Max Premix (2 $\times$ ) 25  $\mu$ L, 无菌水 22  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98  $^{\circ}$ C 10 s, 58  $^{\circ}$ C 10 s, 72  $^{\circ}$ C 20 s, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。将 PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, 用凝胶回收试剂盒回收 VP1 片段。以 pBacPAK9 质粒为模板, 用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Xho* I 切割质粒得到线性化 pBacPAK9。酶切体系: pBacPAK9 质粒 2  $\mu$ g, *Kpn* I 和 *Xho* I 各 1  $\mu$ L, 10 $\times$ Cutsmart 5  $\mu$ L, 无菌水补至总体积为 50  $\mu$ L。37  $^{\circ}$ C 酶切 1 h。VP1 基因连接体系: 线性化 pBacPAK9 2  $\mu$ L, VP1 基因片段 3  $\mu$ L, 2 $\times$  闪电克隆酶 5  $\mu$ L。50  $^{\circ}$ C 条件下连接 30 min, 获得重组质粒 pBacPAK9-8his-VP1。将重组质粒转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂布接种至氨苄青霉素抗性的 LB 固体培养基上, 37  $^{\circ}$ C 培养 16 h 后挑取单菌落进行扩大培养, 提取质粒用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定, 酶切鉴定正确的质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

#### 1.4 表达 VP1 蛋白重组杆状病毒的制备

将 pBacPAK9-8his-VP1 质粒与线性化 Bacmid 用梭华-Sofast 转染试剂共转染至 SF9 细胞构建重组杆状病毒, 具体操作如下: 将 SF9 细胞接种至 6 孔细胞培养板, 细胞密度为  $1.5\times 10^6$  个/mL, 细胞贴壁后进行转染。转染体系分为 A 液和 B 液两部分进行制备, A 液: 线性 Bacmid 4  $\mu$ L, pBacPAK9-8his-VP1 质粒 4  $\mu$ g, IB908 培养基 100  $\mu$ L; B 液: 转染试剂 5  $\mu$ L, IB908 100  $\mu$ L。将 B 液吸取后轻轻加至 A 液中并轻轻吹打混匀,

室温静置 20 min, 将混合液缓慢滴加至细胞培养孔, 用封口膜封住 6 孔细胞培养板侧面, 27  $^{\circ}$ C 静置培养。转染 6 d 后, 收获细胞悬液 2 mL 即为 P1 代重组杆状病毒。为提高重组杆状病毒效价, 取 P1 代病毒继续在 SF9 细胞中传代, 6 d 后收集细胞悬液即为 P2 代重组杆状病毒。取 P2 代病毒在 SF9 细胞中传代, 6 d 后收获细胞悬液即为 P3 代重组杆状病毒。

#### 1.5 VP1 蛋白在 HF 昆虫细胞中的表达和鉴定

取对数生长期的 HF 细胞(密度为  $2.5\times 10^6$  个/mL) 800 mL 接入 2 L 摇瓶中, 取 P3 代重组杆状病毒按体积分数 1%接种至 2 L 摇瓶中。感染病毒的 HF 细胞 27  $^{\circ}$ C、120 r/min 培养 3 d, 培养结束后收获 HF 细胞进行 VP1 蛋白的鉴定。取 1 mL 接毒的 HF 细胞悬液, 12 000 r/min 离心 1 min, 收集细胞, 加入 600  $\mu$ L PBS 缓冲液, 用超声波对 HF 细胞进行破碎。超声破碎程序: 工作 2 s, 停止 3 s, 总时间 2 min, 功率占比 30%。超声结束后, 12 000 r/min 离心 1 min, 收集上清。同时收集未接毒的 HF 细胞进行相同处理作为对照。取 80  $\mu$ L 细胞上清加入 20  $\mu$ L 5 $\times$ Loading buffer, 煮沸 10 min, 用 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定蛋白的表达。

SDS-PAGE 检测流程: 制备 12%的蛋白胶, 按照 Marker、表达样品和 HF 细胞的加样顺序加入, 80 V 电压 20 min, 140 V 电压 40 min。电泳结束后, 将蛋白胶用考马斯亮蓝染色液进行成像观察。

Western blotting 鉴定蛋白流程: 细胞上清经 SDS-PAGE 后, 将蛋白胶上的蛋白转至硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜, 用等渗缓冲盐溶液(tris-HCl buffer solution tween, TBST)洗膜 3 次, 每次 5 min, 用含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭液封闭 NC 膜, 150 r/min 摇床室温封闭 1 h。用

TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 将 GII.4 型 HuNoV 兔源多克隆性抗体用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液稀释 10 000 倍作为一抗使用, 150 r/min 摇床室温孵育 1 h。用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 二抗为 1:5 000 稀释的 HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体, 150 r/min 摇床室温孵育 30 min。用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 最后加入 ECL 化学发光液进行显色处理, 观察结果。

### 1.6 VP1 蛋白的纯化

取 1.4 杆状病毒感染的 HF 细胞, 在 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 20 min, 收集细胞, 称量细胞质量。按照 1 g 细胞 10 mL 缓冲液比例, 用缓冲液 A 液(50 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl 和 5 mmol/L 咪唑, pH 7.4)对细胞进行重悬。用超声波破碎仪对细胞悬液进行破碎, 超声破碎程序: 开 2 s 关 3 s, 总时间 15 min, 功率占比 60%。超声结束后, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清, 上清经 0.45 μm 滤器进行过滤。过滤后的溶液使用镍柱利用全自动化蛋白纯化仪对 VP1 蛋白进行纯化: 首先使用超纯水对机器管路进行冲洗, 流速设置 8 mL/min, 待基线(蛋白吸收峰, 电导, pH)平衡后, 连接 5 mL 的镍柱预装柱, 将 A 泵放置缓冲液 A 液中, B 泵放置缓冲液 B 液(50 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl 和 500 mmol/L 咪唑, pH 7.4)中。然后使用缓冲液 B 液对镍柱进行清洗, 设置 100%缓冲液 B 液, 流速调整至 2 mL/min, 待基线平衡后, 切换至 100%缓冲液 A 液, 待基线平衡后, 将 A 泵放于待上样的样品中上样, 上样结束后 A 泵再次放入缓冲液 A 液中; 待基线平衡后, A 泵放入 0.5 mol/L NaCl 溶液中, 目的是去除镍柱非特异性结合蛋白。基线再次平衡后放入 A 液, 调整 20% B 液, 目的是去除镍柱结合力较弱的杂蛋白。待基线平衡后, 使用 100%缓冲液 B 液洗脱目的蛋白, 根据洗脱峰收集目的蛋白。最后洗脱结束后, 使

用 2 mol/L NaCl 溶液进行柱子清洗, 用 20%乙醇进行封柱, 待基线平衡后, 取下镍柱放置 4 °C 冰箱保存。收集的蛋白处于高浓度咪唑中, 使用透析袋将咪唑透析出去, 透析液为不含咪唑的缓冲液 A 液, 透析比例: 1 mL 样品使用 100 mL 缓冲液。透析条件: 4 °C、300 r/min 透析过夜。透析后的蛋白用 0.22 μm 滤器过滤, 对蛋白分装保存。

### 1.7 VP1 蛋白的纯度的鉴定

使用高效液相色谱仪对 VP1 蛋白的纯度进行鉴定: 使用经过 0.45 μm 滤膜过滤并超声脱气的超纯水置换高效液相色谱仪中的保存液, 将色谱柱中的保存液 50%甲醇置换掉。之后将超纯水换为流动相(50 mmol/L PB, 300 mmol/L NaCl, pH 7.0), 平衡色谱柱, 至基线平稳。4 °C 取出待上样的样品 200 μL, 加入到色谱柱专用瓶中。色谱柱型号: BioCore SEC-500 高效液相 SEC 色谱柱(柱参数: 7.8 mm×300 mm; 粒径: 5 μm; 填料孔径: 500 Å); 采集流速: 0.8 mL/min; 检测器: UV 检测器; 采集波长: 280 nm; 柱温: 25 °C; 样品室温度: 25 °C; 上样量: 50 μL; 采集时间: 25 min。25 min 后, 将流动相切换至纯水, 待基线平稳后, 切换至保存液 50%甲醇, 待基线平稳后, 取出柱子, 关闭高效液相色谱仪进行检测, 对结果进行分析。

### 1.8 HuNoV VLP 的观察

取纯化的蛋白样品 200 μL, 滴于载玻片表面, 形成水滴状, 镊子取出铜网放置于液体表面。样品固定 1 min, 用吸水纸吸取铜网侧面水分, 晾干至水膜消失, 用 2%的磷钨酸进行染色 1 min, 用吸水纸吸取铜网侧面水分, 晾干, 用透射电子显微镜观察 VP1 蛋白。

## 2 结果与分析

### 2.1 pBacPAK9-8his-VP1 质粒的构建和鉴定

PCR 扩增的 VP1 基因 5'端和 3'端各带有与

线性化 pBacPAK9 载体同源的序列, 闪电克隆酶利用同源重组的原理, 将 VP1 基因序列连接至 pBacPAK9 载体。构建的重组质粒 pBacPAK9-8his-VP1 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后, 用 1% 的琼脂糖电泳检测, 结果显示可以分离出大小约 1 700 bp 的 VP1 基因片段(图 1)。VP1 基因测序结果完全匹配密码子优化后的序列, 说明重组质粒 pBacPAK9-8his-VP1 构建成功。

## 2.2 表达 VP1 重组杆状病毒在 SF9 细胞中的制备

显微镜下观察未转染质粒的 SF9 细胞, 结果显示细胞形态清晰, 生长良好, 大小较均一(图 2A)。转染 pBacPAK9-8his-VP1 质粒与线性化 Bacmid 的 SF9 细胞可以观察到细胞形态直径变大, 出现肿胀破裂现象(图 2B), 说明重组杆状病毒初步制备成功。收集 P1 代的杆状病毒继续传至 P3 代, 仍然可以观察到 SF9 细胞发生细胞病变效应, 说明重组杆状病毒制备成功。

## 2.3 VP1 蛋白在 HF 昆虫细胞中的表达和鉴定

VP1 蛋白大小约为 58 kDa, 与未感染杆状病毒的 HF 细胞相比, 感染杆状病毒的 HF 细胞 SDS-PAGE 检测结果显示: 在 55–70 kDa 之间有

较粗蛋白条带, 初步说明 VP1 蛋白在 HF 细胞中可以表达(图 3A)。Western blotting 使用 HuNoV 的多克隆抗体作为一抗, 结果显示在 55–70 kDa 之间存在特异性蛋白条带(图 3B), 说明表达 VP1 蛋白在 HF 细胞中成功表达。

## 2.4 纯化后 VP1 蛋白的鉴定

VP1 蛋白经过镍柱纯化后, SDS-PAGE 结果显示在 55–70 kDa 之间有单一条带(图 4A), Western blotting 结果显示在 55–70 kDa 之间有单

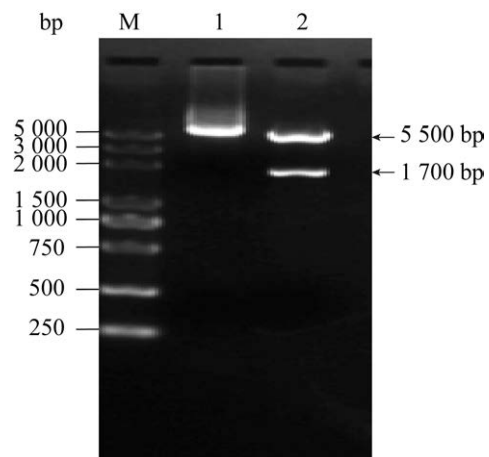


图 1 重组质粒 pBacPAK9-8his-VP1 双酶切鉴定  
Figure 1 Identification of pBacPAK9-8his-VP1 plasmid digested by double restriction enzyme. M: DL5000 DNA Marker; Lane 1: pBacPAK9-8his-VP1 plasmid; Lane 2: pBacPAK9-8his-VP1 plasmid digested by *Bam*H I and *Xho* I.

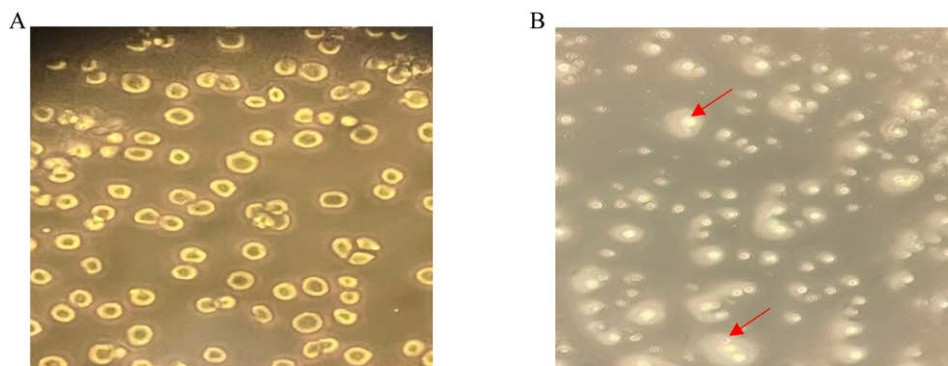


图 2 重组杆状病毒在 SF9 细胞(400×)中的制备

Figure 2 Preparation of recombinant baculovirus in SF9 cells (400×). A: SF9 cells without plasmid transfected used as control. B: Cytopathic effect caused by recombinant baculovirus infection in SF9 cells (arrow indication).

一条带(图 4B),符合 VP1 蛋白的大小。说明 VP1 蛋白已经成功纯化。纯化后的 VP1 蛋白使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行检测:800 mL HF 细胞培养 3 d 后可获得约 20 g 细胞,从 20 g 细胞中可以纯化出约 300 mg 的 VP1 蛋白。

## 2.5 HPLC 鉴定 VP1 蛋白纯度

HPLC 鉴定结果显示,不含咪唑的缓冲液 A 液在 13.8–15.8 min 时会出现波动,利用不含咪

唑的缓冲液 A 液(图 5A)作为对照,判断出 HPLC 可信区间为 1.0–13.8 min, HPLC 结果显示纯化的 VP1 蛋白纯度>99% (图 5B)。

## 2.6 透射电镜下观察 VLP

HuNoV VP1 蛋白在透射电子显微镜下的观察结果如图 6 所示,VP1 蛋白自组装形成大小均一、形态规则、直径约为 30–40 nm 的 VLP,说明昆虫细胞表达的 VP1 蛋白可以在细胞内自组装成 VLP。

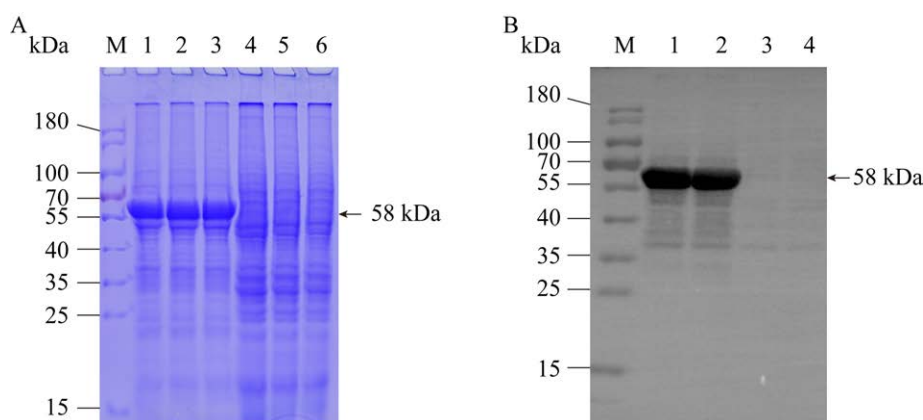


图 3 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测 VP1 蛋白的表达

Figure 3 The expression of VP1 protein was identified by SDS-PAGE and Western blotting. A: VP1 protein expression was identified by SDS-PAGE. M: Protein molecular weight marker; Lane 1–3: Supernatant of virus-infected HF cells lysate; Lane 4–6: Supernatant of HF cells lysate. B: VP1 protein expression was identified by Western blotting. M: Protein molecular weight marker; Lane 1–2: Supernatant of virus-infected HF cells lysate; Lane 3–4: Supernatants of HF cells lysate.

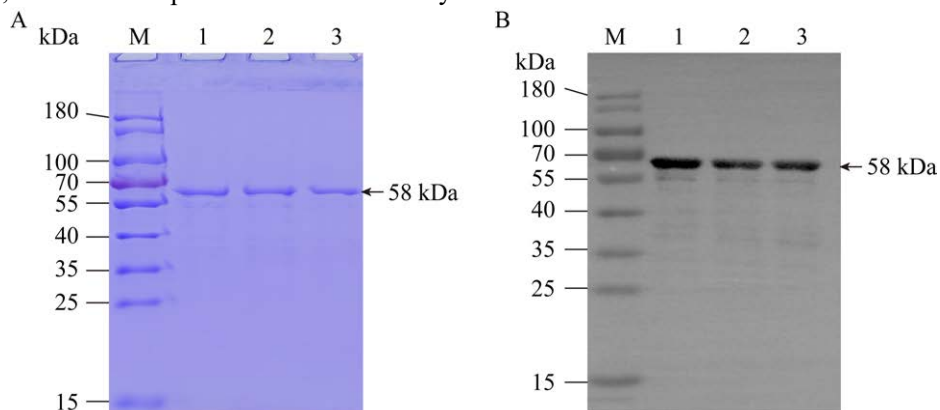


图 4 纯化后的 VP1 蛋白 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测结果

Figure 4 The purified VP1 protein was detected by SDS-PAGE and Western blotting. A: VP1 protein expression was identified by SDS-PAGE. B: VP1 protein expression was identified by Western blotting. M: Protein molecular weight marker; Lane 1–3: VP1 protein.



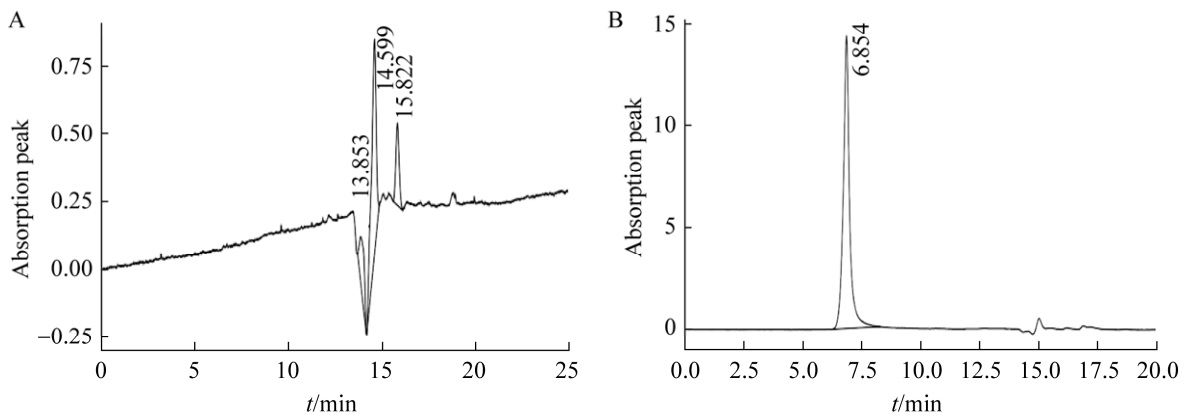


图 5 HPLC 检测 VP1 蛋白的纯度

Figure 5 The purity of VP1 protein detected by HPLC. A: Buffer A without imidazole detected by HPLC. B: VP1 protein detected by HPLC.

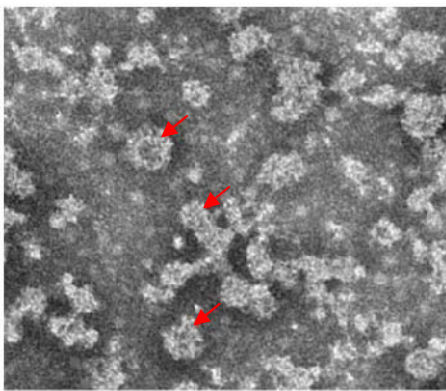


图 6 透射电镜观察 VP1 蛋白自组装形成的病毒样颗粒(60 000×)

Figure 6 Observation of VLP formed by self-assembly of VP1 protein observed by transmission electron microscopy (60 000×) (arrow indication).

### 3 讨论

HuNoV 是世界范围内引起人急性胃肠炎的主要病原之一,该病毒引起的疾病是全球性的公共卫生问题。目前尚无获批的疫苗用于该病毒的预防,也无特效的药物治疗 HuNoV 感染引起的疾病。HuNoV 疫苗研发的困难主要有 3 个原因: (1) HuNoV 分型较多,抗原变异大,不同 HuNoV 基因组之间几乎无交叉保护性,同组内不同型别

毒株之间交叉保护性弱,导致疫苗研发难度大<sup>[16]</sup>; (2) HuNoV 目前尚不能进行体外细胞分离培养,也无合适的动物模型培养病毒,所以制备弱毒疫苗或灭活疫苗难度较大; (3) 对 HuNoV 的免疫学认识尚不足,病毒感染机体后免疫保护特征、病毒变异以及免疫保护相关性研究不够深入<sup>[17]</sup>。虽然 HuNoV 的疫苗研发较为困难,但是目前国内外已经有多款疫苗正在研究,这些疫苗主要有两大类。第一类是 HuNoV 的 VLP 亚单位疫苗<sup>[18-19]</sup>,第二类是基于腺病毒载体或水泡性口炎病毒载体表达 VP1 蛋白的重组活病毒载体疫苗<sup>[20-21]</sup>。本研究的主要目的是利用 flashBAC 杆状病毒表达系统,通过在昆虫细胞中表达目前流行最广泛的 GII.4 型 HuNoV 的 VP1 蛋白,观察表达的 VP1 蛋白能否形成 VLP,为 HuNoV 亚单位疫苗的研发提供参考。

VLP 是由病毒单一或多个结构蛋白自行装配而形成的高度结构化的蛋白质颗粒,保留了病毒蛋白的天然构象,具备激发宿主先天和适应性免疫反应的能力。此外 VLP 不含有病毒的遗传物质,所以其安全性要高于灭活和弱毒疫苗,这使 VLP 在疫苗研发中更具有优势。关于病毒



VLP 的制备, 目前已经有几十种感染人和动物的病毒制备了 VLP, 如人乳头瘤病毒<sup>[22]</sup>、流感病毒<sup>[23]</sup>、口蹄疫病毒<sup>[24]</sup>、鸭细小病毒<sup>[25]</sup>等。关于 VLP 的制备, 主要包括大肠杆菌表达系统、酵母表达系统、哺乳动物细胞表达系统以及杆状病毒表达系统。本研究使用的杆状病毒表达系统制备的 VLP 具有如下优势:(1) 杆状病毒主要感染昆虫细胞, 不感染哺乳动物和人类细胞, 安全性高;(2) 杆状病毒表达系统属于真核生物表达系统, 能实现蛋白的正确折叠和翻译后的修饰;(3) 杆状病毒感染的昆虫细胞可以实现转瓶培养, 蛋白产量高, 便于纯化, 适合规模化生产。本研究中制备的 VLP 是通过 HF 细胞的转瓶培养获得的, 方便了后期 VLP 的大量生产;(4) 目前报道的使用杆状病毒表达系统制备 VLP 主要是 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统<sup>[15]</sup>, flashBAC 系统是 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统的一种改进版本, 与 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统相比, flashBAC 系统构建重组杆状病毒无需蓝白斑筛选工作, 极大缩短了重组杆状病毒的构建时间, 加快了实验进程。此外, 本研究通过镍柱亲和层析法纯化即可得到高纯度的蛋白, 经过 HPLC 的检测, VP1 纯度在 99%以上。传统的氯化铯梯度离心法纯化 HuNoV 的 VLP<sup>[15]</sup>, 其产量往往比较低, 本研究使用的亲和层析法纯化 VLP 操作简单、产量较高, 不需要超高速离心机等贵重的仪器设备, 更适用于 VLP 的大量生产。总之, flashBAC 系统在继承了传统 Bac-to-Bac 系统优势的基础上, 通过技术上的优化和改进, 提供了一种更为高效和方便的重组蛋白表达解决方案, 这些优势使得 flashBAC 系统在蛋白质的真核表达方面具有较好的应用前景。

当前 HuNoV 主要流行毒株的基因型是 GII.4 型, 为制备该基因型病毒的 VLP, 我们首

先将 VP1 基因序列根据昆虫细胞的密码子偏好性进行了优化, 构建了表达 VP1 蛋白的杆状病毒转移载体, 在 SF9 昆虫细胞中成功包装了表达 VP1 蛋白的杆状病毒; 其次, 制备的杆状病毒感染 HF 昆虫细胞, 该细胞可以使用转瓶进行悬浮培养, 蛋白产量较高。为了方便蛋白的纯化, 在 VP1 蛋白的氨基酸端添加了 8 个组氨酸标签, 可以利在全自动蛋白纯化仪上用镍柱对 VP1 蛋白进行纯化。VP1 蛋白经 HPLC 的鉴定, 蛋白纯度在 99%以上, 说明本研究建立的 VP1 蛋白制备和纯化方法具有较好的工艺流程。最后通过透射电子显微镜的观察, 发现 VP1 蛋白可以自组装形成大小均一、形态规则、直径约为 30–40 nm 的 VLP。

## 4 结论

本研究利用 flashBAC 杆状病毒表达系统成功表达了 GII.4 型 HuNoV 的 VP1 蛋白, VP1 蛋白的纯度在 99%以上, VP1 蛋白可以组装成 VLP。本研究为研发 GII.4 型 HuNoV 亚单位疫苗奠定了物质基础, 同时也为其他基因型 HuNoV VLP 的制备提供了技术参考。

## 参考文献

- [1] FLYNN TG, OLORTEGUI MP, KOSEK MN. Viral gastroenteritis[J]. *Lancet*, 2024, 403(10429): 862-876.
- [2] ATMAR RL, OPEKUN AR, GILGER MA, ESTES MK, CRAWFORD SE, NEILL FH, GRAHAM DY. Norwalk virus shedding after experimental human infection[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14(10): 1553-1557.
- [3] DEANTONIO R, HESS-HOLTZ M, ABREGO L, CAPITAN-BARRIOS Z, DONOSO LH, DE LEÓN T, SÁEZ LLORENS X, MORENO B, WEIL JG. Norovirus in children under 2 years of age: an epidemiological study in Panama during the COVID-19 pandemic[J]. *Frontiers in Pediatrics*, 2024, 12: 1292967.

- [4] SATTER SM, ABDULLAH Z, FARIHA F, KARIM Y, RAHMAN MM, BALACHANDRAN N, GHOSH PK, HOSSAIN ME, MIRZA SA, HALL AJ, GASTAÑADUY PA, RAHMAN M, VINJÉ J, PARASHAR UD. Epidemiology and risk factors of norovirus infections among diarrhea patients admitted to tertiary care hospitals in Bangladesh[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2023, 228(7): 818-828.
- [5] LOPMAN BA, STEELE D, KIRKWOOD CD, PARASHAR UD. The vast and varied global burden of norovirus: prospects for prevention and control[J]. *PLoS Medicine*, 2016, 13(4): e1001999.
- [6] THORNE LG, GOODFELLOW IG. Norovirus gene expression and replication[J]. *Journal of General Virology*, 2014, 95(Pt 2): 278-291.
- [7] KIM NE, KIM MJ, PARK BJ, KWON JW, LEE JM, PARK JH, SONG YJ. A DNA vaccine against GII.4 human norovirus VP1 induces blocking antibody production and T cell responses[J]. *Vaccine*, 2024, 42(6): 1392-1400.
- [8] SALMEN W, HU L, BOK M, CHAIMONGKOL N, ETTAYEBI K, SOSNOVTSEV SV, SONI K, AYYAR BV, SHANKER S, NEILL FH, SANKARAN B, ATMAR RL, ESTES MK, GREEN KY, PARREÑO V, VENKATARAM PRASAD BV. A single nanobody neutralizes multiple epochally evolving human noroviruses by modulating capsid plasticity[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 6516.
- [9] FORD-SILTZ LA, WALES S, TOHMA K, GAO Y, PARRA GI. Genotype-specific neutralization of norovirus is mediated by antibodies against the protruding domain of the major capsid protein[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2022, 225(7): 1205-1214.
- [10] LINDESMITH LC, MCDANIEL JR, CHANGELA A, VERARDI R, KERR SA, COSTANTINI V, BREWER-JENSEN PD, MALLORY ML, VOSS WN, BOUTZ DR, BLAZECK JJ, IPPOLITO GC, VINJE J, KWONG PD, GEORGIU G, BARIC RS. Sera antibody repertoire analyses reveal mechanisms of broad and pandemic strain neutralizing responses after human norovirus vaccination[J]. *Immunity*, 2019, 50(6): 1530-1541.e8.
- [11] HE X, JIANG N, LI Y. *Saccharomyces cerevisiae* cells that display norovirus P induce both systemic and mucosal neutralizing antibodies[J]. *Virology*, 2024, 594: 110034.
- [12] BONURA F, FILIZZOLO C, PIZZO M, SANFILIPPO GL, CACIOPPO F, PALAZZOTTO E, Di BERNARDO F, COLLURA A, MARTELLA V, DE GRAZIA S, GIAMMANCO GM. Biological specimen banking as a time capsule to explore the temporal dynamics of norovirus epidemiology[J]. *Viruses*, 2023, 15(12): 2303.
- [13] CHHABRA P, TULLY DC, MANS J, NIENDORF S, BARCLAY L, CANNON JL, MONTMAYEUR AM, PAN CY, PAGE N, WILLIAMS R, TUTILL H, ROY S, CELMA C, BEARD S, MALLORY ML, MANOUANA GP, VELAVAN TP, ADEGNIKA AA, KREMSNER PG, LINDESMITH LC, et al. Emergence of novel norovirus GII.4 variant[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2024, 30(1): 163-167.
- [14] SION E, AB-RAHIM S, MUHAMAD M. Trends on human norovirus virus-like particles (HuNoV-VLPs) and strategies for the construction of infectious viral clones toward *in vitro* replication[J]. *Life*, 2023, 13(7): 1447.
- [15] DEVANT JM, HOFHAUS G, BHELLA D, HANSMAN GS. Heterologous expression of human norovirus GII.4 VP1 leads to assembly of T=4 virus-like particles[J]. *Antiviral Research*, 2019, 168: 175-182.
- [16] 谢迪, 何莲花, 刘晖, 李金松. 人诺如病毒感染引起的急性胃肠炎流行特征及其影响因素的研究进展[J]. *病毒学报*, 2024, 40(1): 140-150.
- XIE D, HE LH, LIU H, LI JS. Research advances in the epidemic characteristics and influencing factors of human norovirus infection-induced acute gastroenteritis[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2024, 40(1): 140-150 (in Chinese).
- [17] FORD-SILTZ LA, TOHMA K, PARRA GI. Understanding the relationship between norovirus diversity and immunity[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1-13.
- [18] PARRA GI, BOK K, TAYLOR R, HAYNES JR, SOSNOVTSEV SV, RICHARDSON C, GREEN KY. Immunogenicity and specificity of norovirus consensus GII.4 virus-like particles in monovalent and bivalent vaccine formulations[J]. *Vaccine*, 2012, 30(24): 3580-3586.

- [19] HOU W, LV L, WANG Y, XING M, GUO Y, XIE D, WEI X, ZHANG X, LIU H, REN J, ZHOU D. 6-valent virus-like particle-based vaccine induced potent and sustained immunity against noroviruses in mice[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 906275.
- [20] GUO L, WANG J, ZHOU H, SI H, WANG M, SONG J, HAN B, SHU Y, REN L, QU J, HUNG T. Intranasal administration of a recombinant adenovirus expressing the norovirus capsid protein stimulates specific humoral, mucosal, and cellular immune responses in mice[J]. *Vaccine*, 2008, 26(4): 460-468.
- [21] MA Y, LI J. Vesicular stomatitis virus as a vector to deliver virus-like particles of human norovirus: a new vaccine candidate against an important noncultivable virus[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(6): 2942-2952.
- [22] STANLEY M. Hpv vaccines: alternative dosage schedules[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2019, 18(12): 1309-1316.
- [23] PUSHKO P, TRETAKOVA I. Influenza virus like particles (VLPs): opportunities for H7N9 vaccine development[J]. *Viruses*, 2020, 12(5): 518.
- [24] 谭书楨, 董虎, 孙世琪, 郭慧琛. 口蹄疫病毒样颗粒诱导表达型载体的构建及其 BHK-21 细胞池的筛获[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(12): 4849-4860.
- TAN SZ, DONG H, SUN SQ, GUO HC. Construction of foot-and-mouth disease virus like particles-induced expression vectors and screening of BHK-21 cell pools[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(12): 4849-4860 (in Chinese).
- [25] 邹昕熠, 杜彦妮, 陈姝汐, 周文笛, 王文秀, 张馨月, 刘文涛, 蔡春雨, 罗启慧. 新型鸭细小病毒样颗粒的制备及鉴定[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(12): 5404-5412.
- ZOU XY, DU YN, CHEN SX, ZHOU WD, WANG WX, ZHANG XY, LIU WT, CAI CY, LUO QH. Preparation and identification of novel duck parvovirus virus-like particles[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(12): 5404-5412 (in Chinese).