

DOI:10.13350/j.cjpb.221201

• 论著 •

GII. P16-GII. 2 型诺如病毒 VLPs 的纯化研究*

程成^{1,2,3}, 李秋璇^{1,2,3}, 白冰², 张鑫^{1,2}, 李善智¹, 李玥¹, 李卓昕^{2,3}, 王鹏^{2,3}, 金宁一^{1,2,3**}, 鲁会军^{2**}, 韩继成^{1,2**}

(1. 长春中医药大学院士工作站, 吉林长春 133117; 2. 军事科学院军事医学研究院军事兽医研究所;
3. 吉林农业大学动物科技学院)

【摘要】 目的 诺如病毒(Norovirus)是一种重要的人畜共患病病毒,可感染人、猪、牛、犬等多种动物,引起诺如病毒病,每年给全球造成巨大的经济损失。本研究基于 AKTA 纯化系统探索诺如病毒 VLPs 的纯化工艺。方法 将诺如病毒重组杆状病毒接种到 SF9 细胞中培养,通过 Western blot、间接免疫荧光试验以及 SDS-PAGE 进行鉴定,对鉴定正确的细胞培养产物采用阴、阳离子柱进行病毒的层析纯化,并对层析柱的选择、层析缓冲液的 pH 值、洗脱液 NaCl 浓度等进行优化。基于优化后的参数或条件通过 AKTA 纯化系统纯化诺如病毒 VLPs,分析纯化效果。结果 经 Western blot、间接免疫荧光、以及 SDS-PAGE 等鉴定,诺如病毒重组杆状病毒转染 SF9 细胞后表达诺如病毒 VLPs。采用阴、阳离子柱进行病毒的层析纯化,优化的纯化参数或条件为:阴离子纯化柱,层析缓冲液 pH 值为 6.0,洗脱液 NaCl 浓度为 0.2 mol/L。结论 诺如病毒重组杆状病毒转染 SF9 细胞后表达诺如病毒 VLPs。优化的 AKTA 纯化系统可用于诺如病毒 VLPs 的纯化。

【关键词】 诺如病毒;病毒样颗粒;AKTA 纯化系统;蛋白纯化

【中图分类号】 R373.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)12-1365-04

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Dec;17(12):1365-1368.]

Study on purification of GII. P16-GII. 2 norovirus virus-like particles

CHENG Cheng^{1,2,3}, LI Qiu-xuan^{1,2,3}, BAI Bing², ZHANG Jin-xin^{1,2}, LI Shan-zhi¹, LI Yue¹, LI Zuo-xin^{2,3}, WANG Peng^{2,3}, LU Hui-jun², JIN Ning-yi^{1,2}, HAN Ji-cheng^{1,2} (1. Academician workstation, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 133117, China; 2. Military Veterinary Institute, Academy of Military Sciences; 3. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University)

【Abstract】 **Objective** Norovirus is an important zoonotic virus that can infect humans, pigs, cattle, dogs and other animals, causing huge economic damage to the world every year. In this study, the purification of norovirus virus-like particles was explored based on the AKTA purification system. **Methods** Norovirus recombinant baculovirus was inoculated into SF9 cells and identified by Western blot, indirect immunofluorescence, and SDS-PAGE. After the identification is correct, the obtained cell culture products are optimized for the selection of anion and cation columns, pH value, eluent concentration and other parameters. Purification of norovirus virus-like particles was performed by the AKTA purification system based on the optimized parameters. **Results** Identification methods such as Western blot, indirect immunofluorescence, and SDS-PAGE proved that the recombinant baculovirus successfully expressed norovirus virus-like particles. The results of purification parameters showed that norovirus virus-like particles could be successfully purified by using an anion purification column, pH value of 6.0, and eluent concentration of 0.2 mol/L. **Conclusion** The study successfully purified norovirus virus-like particles using the AKTA purification system, which can be used for the purification of norovirus virus-like particles.

【Key words】 Norovirus; VP1; Virus-like particle; AKTA purification system; Protein purification

*** 诺如病毒(Norovirus, NoV)是一种人兽共患病病毒,可感染人以及多种动物^[1]。目前,诺如病毒与全球近 20% 的急性腹泻病有关,每年发生约 6.85 亿次诺如病毒感染并导致 21.2 万人死亡^[1-2]。在美国,每年因 NoV 感染导致 10.3 万人住院、46 万人次急诊就诊和 260 万人次门诊就诊, NoV 感染每年造成巨大的经济损失^[1,3]。

NoV 基因组包含约 7 700 个核苷酸的正链单链多腺苷酸化 RNA,具有 3 个开放阅读框(ORFs 1-

* **【基金项目】** 国家科技重大专项“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”课题(No. 2018ZX10102001);吉林省教育厅科学研究项目(No. JJKH20220889KJ);长春中医药大学青年科学家项目(No. QNKXJ2-2021ZR31);第六批吉林省青年科技人才托举工程项目(No. QT202228)。

** **【通讯作者】** 韩继成, E-mail: 373108406@qq.com;
鲁会军, E-mail: huijun_lu@126.com;
金宁一, E-mail: ningyik@126.com

【作者简介】 程成(1994-),女,硕士研究生,主要从事病毒学研究工作。E-mail: 2392062177@qq.com。
李秋璇和程成为共同第一作者。

3)^[1]。目前, NoV 分为 10 个基因组: GI-GX, 其中与人类疾病有关的菌株属于 3 个基因组: GI、GII 和 GIV^[4]。目前世界范围内主要流行基因型为 GII. 4 型。最近出现了 2 种带有 RdRp 基因型 GII. P16 和另外 2 种 VP1 基因型的重组诺如病毒在全球传播: 2016 年在美国和欧洲流行的 GII. P16-GII. 4 和在欧洲和亚洲流行的 GII. P16-GII. 2^[4-5]。有研究指出 GII. P16-GII. 2 存在与 GII. 4 和 GII. P17 一样的高致病性与高流行性^[5]。因此, GII. P16-GII. 2 型诺如病毒应引起重视。

NoV 是全球 AGEs(晚期糖基化终末产物)的主要原因, 因此通过疫苗接种预防 NoV 感染是当务之急^[6-7]。然而, NoV 疫苗的开发面临着重大挑战, 目前尚无已批准使用的商品化疫苗, 而临床试验中最有效的诺如病毒疫苗是基于病毒样颗粒(VLP)的疫苗, 现有研究表明诺如病毒 VLP 疫苗具有良好的安全性^[1]。

本研究用已构建的诺如病毒重组杆状病毒制备 GII. P16-GII. 2 型诺如病毒病毒样颗粒, 通过 AKTA 纯化系统纯化诺如病毒的病毒样颗粒, 并对层析条件进行优化, 为诺如病毒疫苗的研发奠定基础。

材料与方 法

1 材 料

1.1 病毒、细胞 诺如病毒重组杆状病毒由本实验室构建并保存; SF9 细胞购自北纳生物。

1.2 主要试剂 anti-His 单克隆抗体购于中美国 CST 公司; HRP 标记的兔源 IgG 二抗购武汉三鹰公司; Bis-Tris, 阴离子柱(Q 柱)及阳离子柱(SP 柱)均购自中国武汉汇研生物公司; 彩虹蛋白 Maker 购于全式金公司; SF900 细胞培养基购自美国赛默飞世尔科技有限公司。

2 方 法

2.1 重组病毒的转染及 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定 将 SF9 细胞细胞浓度调整为 1×10^6 并铺到 6 孔板中培养 12h, 加入重组杆状病毒继续培养 48h, 收集细胞, 制备蛋白样品, 以 10% 的分离胶进行 SDS-PAGE, 再将分离胶蛋白转移至 0.45 μm 的 NC 膜, 用快速封闭液室温封闭 40 min; 加入一抗 anti-His 抗体, 室温孵育 1.5 h, 洗涤; 加入 HRP 标记的小鼠二抗, 室温孵育 45 min, 洗涤后曝光显影。

2.2 间接免疫荧光鉴定 将 SF9 细胞细胞浓度调整为 1×10^6 并铺到 6 孔板中, 培养 12 h; 加入重组杆状病毒培养 48 h, 弃掉 6 孔板中培养基, 无菌 PBS 清洗 3 遍; 加入细胞固定液固定 8 min, 加入适量的 Trion X-100(0.25%) 透化处理 5 min, 再加入适量的 1% BSA 封闭处理 50 min; 加入 anti-His 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,

洗涤; 加入 FITC 标记的荧光二抗, 室温避光孵育 50 min, 洗涤; 加入适量 DIPI 避光处理 3 min, 置荧光显微镜下观察。

2.3 VLPs 的制备 将悬浮培养的 SF9 细胞密度调整为 2×10^6 个/L, 摇瓶培养 3 h; 加入诺如病毒重组杆状病毒培养 72 h; 收集细胞, 在冰浴条件下超声破碎(30 W, 5 min), 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12 000 r/min(离心半径 7 cm)离心 4 min, 收集含 VLPs 上清。

2.4 阴、阳离子柱的选择 为了明确诺如病毒 VLPs 与阴离子柱及阳离子柱的填料的结合情况, 取 500 μL 制备的 VLPs 溶液分别与 500 μL 阴阳离子填料(20 mmol/L Bis-Tris 溶液处理)室温混合 5 min。结合后将 VLPs 与阴阳离子填料混合液以 12 000 r/min 离心 3 min, 取 100 μL 上清制样并进行 SDS-PAGE 检测。

2.5 层析缓冲液 pH 值的选择 为了获得最佳纯化效率, 分别将层析缓冲液的 pH 值调整为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0。将含有 VLPs 的不同 pH 值的层析缓冲液与离子填料混合, 然后以 12 000 r/min 离心 3 min, 取 100 μL 上清制样并进行 SDS-PAGE 检测。

2.6 洗脱液 NaCl 浓度的选择 使用超纯水清洗预装柱 3 次后加入 5 mL 阴离子填料, 使用平衡缓冲液对柱子进行平衡; 加入 VLPs 与阴离子填料结合, 回收流穿液。再分别用不同浓度的 NaCl 溶液(0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L)洗脱, 回收洗脱液后, 分别取 100 μL 制样并进行 SDS-PAGE 检测。

2.7 AKTA 纯化系统对 VLPs 的纯化 基于纯化参数或条件的优化结果, 利用 AKTA 纯化系统对 VLPs 进行纯化。将阴离子柱(Q 柱)安装在 AKTA 纯化仪上, 将含有诺如病毒 VLPs 的溶液上样, 上样速度设定为 0.5 mL/min。上样结束后分别用不同浓度的 NaCl 溶液(0.05、0.1、0.2 mol/L)进行洗脱, 洗脱速度设定为 1 mL/min, 待出现洗脱峰后开始收集不同洗脱峰的洗脱液。将不同洗脱峰回收液分别制样后进行 SDS-PAGE 检测。

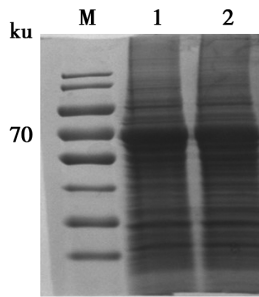
结 果

1 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定

重组杆状病毒感染后收集 SF9 细胞, 分别进行 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定, 结果如图 1、2。重组杆状病毒感染 SF9 细胞表达诺如病毒 VLPs 蛋白。

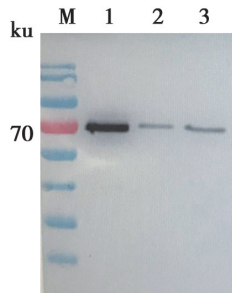
2 间接免疫荧光鉴定

将重组杆状病毒感染 SF9 细胞后, 收集细胞进行间接免疫荧光鉴定, 结果如图 3。绿色代表诺如病毒 VLPs 蛋白表达情况, 蓝色为 DIPI 细胞核染色情况。结果表明重组杆状病毒感染 SF9 细胞后成功表达诺如病毒目的蛋白, 该蛋白相对分子质量约为 70×10^3 , 与预期相符。



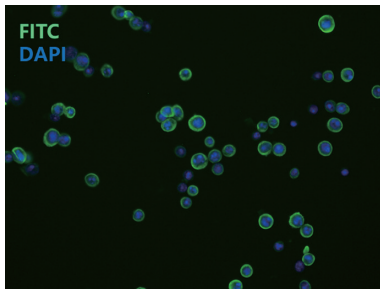
M 蛋白标志物 1,2 诺如病毒 VP1 蛋白
图 1 诺如病毒 VP1 蛋白的 SDS-PAGE 鉴定

M Protein marker 1,2 Norovirus VP1 protein
Fig.1 SDS-PAGE identification results



M 蛋白标志物 1~3 诺如病毒 VP1 蛋白
图 2 诺如病毒 VP1 蛋白的 Western blot 鉴定

M Protein marker 1-3 Norovirus VP1 protein
Fig.2 Western blot identification results



注:绿色荧光代表诺如病毒 VP1 蛋白;蓝色荧光代表 DIPA 染色。

图 3 诺如病毒 VP1 蛋白的间接免疫荧光鉴定

Notes: Green fluorescence; Norovirus VP1 proteins; Blue fluorescence; DIPA staining.

Fig.3 Indirect immunofluorescence identification results

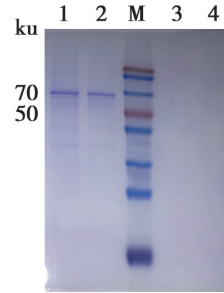
3 阴、阳离子柱的选择

将制备的诺如病毒 VLPs 分别与阴、阳离子柱填料结合后进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 4。诺如病毒 VLPs 与阴离子柱填料结合效率更高,结合后的溶液上清中几乎无残留蛋白。因此确定选用阴离子层析柱用于 VLPs 的纯化。

4 层析缓冲液 pH 值的选择

将含有 VLPs 的不同 pH 值层析缓冲液分别与阴、阳离子层析填料结合后离心,收集上清进行 SDS-PAGE 检测,结果如图 5。当 pH 值为 6.0 时,诺如病毒 VLPs 与阴离子柱的结合效率最高。因此确定层析

缓冲液的最佳 pH 值为 6.0。

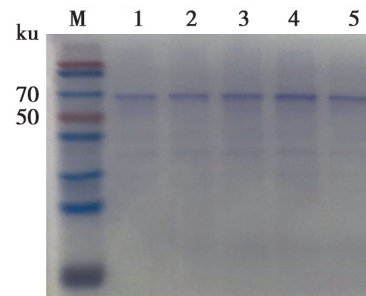


M 蛋白分子质量标准 1,2 VLPs 与阳离子交换剂结合后上清
3,4 VLPs 与阴离子交换剂结合后上清

图 4 阴、阳离子交换剂与 VLPs 结合情况

M Protein marker 1,2 Cation column binding efficiency 3,4 Anion column binding efficiency

Fig.4 Binding of anion and cation columns to VLPs



M 蛋白分子质量标准 1 pH6.0 2 pH6.5 3 pH7.0 4 pH7.5 5 pH8.0

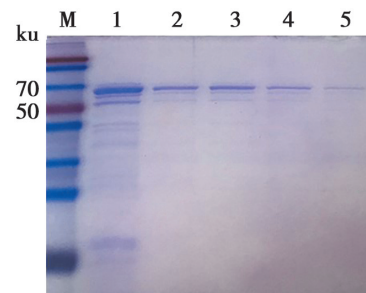
图 5 不同 pH 值层析缓冲液与 VLPs 结合情况

M Protein marker 1 pH6.0 2 pH6.5 3 pH7.0 4 pH7.5 5 pH8.0

Fig.5 Binding efficiencies of buffers and VLPs at different pH values

5 洗脱液 NaCl 浓度的选择

将诺如病毒 VLPs 与阴离子填料结合后用不同浓度的 NaCl 溶液洗脱液洗脱并进行 SDS-PAGE 检测,结果如图 6。NaCl 溶液洗脱液浓度为 0.2 mol/L 时洗脱的目的蛋白条带最为单一,因此确定 0.2 mol/L NaCl 为最佳 NaCl 洗脱液浓度。



M 蛋白分子质量标准 1 流穿液 2 0.1mol/L Nacl 溶液 3 0.2 mol/L Nacl 溶液 4 0.3 mol/L Nacl 溶液 5 0.5 mol/L Nacl 溶液

图 6 不同浓度 NaCl 洗脱液的洗脱效果

M Protein marker 1 Flow-through fluid 2 0.1 mol/L NaCl 3 0.2 mol/L NaCl 4 0.3 mol/L NaCl 5 0.5 mol/L NaCl

Fig.6 Elution results of different concentrations of eluent

6 AKTA 系统纯化效果

基于上述确定的纯化参数或条件通过 AKTA 纯化系统对诺如病毒 VLPs 进行纯化,回收峰如图 7, SDS-PAGE 检测回收峰如图 8,洗脱液浓度为 0.2 mol/L NaCl 时可获得单一目的蛋白条带。将纯化的病毒样颗粒进行电镜观察,结果如图 9,表明诺如病毒 VLPs 纯化成功。

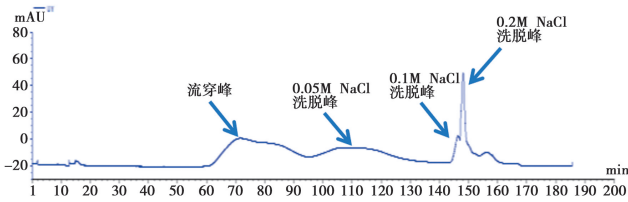
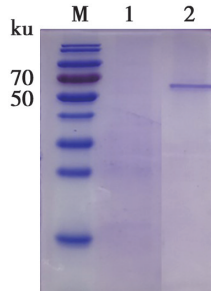


图 7 AKTA 纯化峰
Fig. 7 AKTA Purification peak



M 蛋白分子质量标准 1 流穿液峰 2 0.2 mol/L NaCl 溶液洗脱峰

图 8 AKTA 系统纯化后 SDS-PAGE 检测

M Protein marker 1 Flow-through peak 2 0.2 mol/L NaCl solution eluted peak

Fig. 8 SDS-PAGE detection after purification by AKTA system

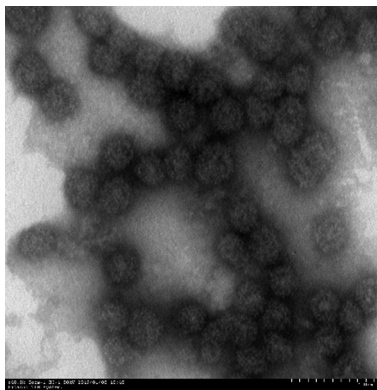


图 9 电镜下的诺如病毒病毒样颗粒 (40 000×)

Fig. 9 Electron microscope observation results of norovirus virus-like particles

讨论

自 2002 年以来, GII. 4 毒株一直被确定为主要基因型^[1]。首次诺如病毒基因型 GII. 4 (Sydney 2012) 大流行发生于 2012 年初, 并很快成为全球主要的流行毒株^[2]。在中国, 诺如病毒爆发感染的数量于 2016 年末大幅增加, 超过了过去 4 年同期的诺如病毒活跃度报

告。这些暴发大多与 GII 有关, 其中 GII. P16-GII. 2 重组型诺如病毒在 2016 年的 56 起暴发中占 79%^[8]。因此, 针对 GII. P16-GII. 2 重组型诺如病毒相关毒株的监测非常必要。

有研究指出, GII. P16-GII. 2 诺如病毒存在与 GII. 4 和 GII. P17 诺如病毒一样的高致病性与高流行性^[5], 因此亟待研发预防 GII. P16-GII. 2 重组型诺如病毒的疫苗。大量研究指出诺如病毒病毒样颗粒疫苗可预防病毒感染^[9-10]。本研究基于杆状病毒表达系统制备了 GII. P16-GII. 2 重组型诺如病毒, 该重组病毒转染细胞后成功表达 VLPs。采用 AKTA 纯化系统对 VLPs 进行纯化, 并通过对离子柱的选择, 以及层析缓冲液 pH 值、NaCl 洗脱液浓度等的优化, 取得良好纯化效果, 为 GII. P16-GII. 2 型诺如病毒 VLP 新型疫苗提研发奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Lucero Y, Matson DO, Ashkenazi S, et al. Norovirus: Facts and reflections from past, present, and future[J]. Viruses, 2021, 13 (12): 2399.
- [2] Farahmand M, Moghoofei M, Dorost A, et al. Global prevalence and genotype distribution of norovirus infection in children with gastroenteritis: A meta-analysis on 6 years of research from 2015 to 2020[J]. Rev Med Virol, 2022, 32(1): e2237.
- [3] Burke RM, Mattison CP, Pindyck T, et al. Burden of norovirus in the united states, as estimated based on administrative data: Updates for medically attended illness and mortality, 2001-2015[J]. Clin Infect Dis, 2021, 73(1): e1-e8.
- [4] Chhabra P, Graaf M, Parra GI, et al. Corrigendum: Updated classification of norovirus genogroups and genotypes[J]. J Gen Virol, 2020, 101(8): 893.
- [5] Chan MCW, Hu Y, Chen H, et al. Global spread of norovirus GII. 17 kawasaki 308, 2014-2016[J]. Emerg Infect Dis, 2017, 23(8): 1359-1354.
- [6] Cannon JL, Lopman BA, Payne DC, et al. Corrigendum to: Birth cohort studies assessing norovirus infection and immunity in young children: A Review[J]. Clin Infect Dis, 2021, 73(12): 2374.
- [7] Hallowell BD, Parashar UD, Hall AJ. Epidemiologic challenges in norovirus vaccine development[J]. Hum Vaccin Immunother, 2019, 15(6): 1279-1283.
- [8] Ao Y, Wang J, Ling H et al. Norovirus GII. P16/GII. 2-Associated Gastroenteritis, China, 2016[J]. Emerg Infect Dis, 2017, 23 (7): 1172-1175.
- [9] Atmar RL, Baehner F, Cramer JP, et al. Rapid responses to 2 virus-like particle norovirus vaccine candidate formulations in healthy adults: a randomized controlled trial[J]. J Infect Dis, 2016, 214(6): 845-853.
- [10] Treanor JJ, Atmar RL, Frey SE, et al. A novel intramuscular bivalent norovirus virus-like particle vaccine candidate-reactogenicity, safety, and immunogenicity in a phase 1 trial in healthy adults[J]. J Infect Dis, 2014, 210(11):

【收稿日期】 2022-07-17 【修回日期】 2022-10-04