

# GI.5和GII.4诺如病毒P蛋白的克隆表达及与长牡蛎类HBGAs的结合特性

佟利惠<sup>1,2</sup>, 杨敏<sup>1,\*</sup>, 王珊珊<sup>1</sup>, 王大军<sup>3</sup>, 王明丽<sup>4</sup>, 周德庆<sup>1</sup>

(1.中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋药物与生物制品功能实验室, 山东 青岛 266071; 2.青岛滨海学院, 山东 青岛 266555; 3.烟台海裕食品有限公司, 山东 烟台 264000; 4.蓬莱汇洋食品有限公司, 山东 烟台 264000)

**摘要:**为明确人诺如病毒(human norovirus, HuNoV)与长牡蛎类组织血型抗原(histo-blood group antigens, HBGAs)的结合特性, 本实验运用大肠杆菌表达系统, 克隆表达了基因簇I.5(genogroup I.5, GI.5)和GII.4 HuNoV P蛋白, 采用酶联免疫吸附测定研究HuNoV P蛋白与唾液HBGAs和长牡蛎类HBGAs的结合特性。结果表明, GII.4 HuNoV与唾液A型、B型、AB型和O型HBGAs均有较好的结合, 而GI.5 HuNoV与B型HBGAs结合较弱, 与O型HBGAs具有明显的结合优势。GI.5和GII.4 HuNoV在长牡蛎鳃、消化腺和外套膜中均可富集, 其中在消化腺中富集最多, 二者主要与类A型和H1型HBGAs结合, GII.4 HuNoV与类Lea型、Leb型、Lex型和Ley型HBGAs有不同程度的结合, 而GI.5 HuNoV与类Leb型HBGAs仅微弱结合, 与类H1型HBGAs具有明显结合优势。综上, 不同型别HuNoV与HBGAs的结合特性不尽相同, GII.4 HuNoV具有广谱结合特性, GI.5 HuNoV具有选择结合特性。

**关键词:**人诺如病毒; P蛋白; 长牡蛎; 组织血型抗原; 结合特性

## Cloning and Expression of Human Norovirus GI.5 and GII.4 P Proteins and Their Binding Characteristics with Histo-Blood Group Antigens-like Substances in Pacific Oysters

TONG Lihui<sup>1,2</sup>, YANG Min<sup>1,\*</sup>, WANG Shanshan<sup>1</sup>, WANG Dajun<sup>3</sup>, WANG Mingli<sup>4</sup>, ZHOU Deqing<sup>1</sup>

(1. Yellow China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory of Marine Drugs and Bioproducts, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China; 2. Qingdao Binhai University, Qingdao 266555, China; 3. Yantai Haiyu Food Co. Ltd., Yantai 264000, China; 4. Penglai Huiyang Food Co. Ltd., Yantai 264000, China)

**Abstract:** To clarify the binding characteristics of human norovirus (HuNoV) with histo-blood group antigens (HBGAs)-like substances from Pacific oysters, this study used an *Escherichia coli* expression system to clone and express HuNoV GI.5 and GII.4 P proteins, and analyzed the binding characteristics of HuNoV P proteins with salivary HBGAs and HBGAs-like substances from Pacific oysters using enzyme-linked immunosorbent assay. The results showed that HuNoV GII.4 exhibited good binding characteristics with blood type A, B, AB, and O salivary HBGAs, while GI.5 HuNoV exhibited weak binding characteristics with blood type B salivary HBGAs but had significant advantage in binding with type O salivary HBGAs. HuNoV GI.5 and GII.4 could be bioaccumulated in the gills, digestive gland, and mantle of Pacific oysters, with the highest bioaccumulation in the digestive gland. Both types of HuNoV were mainly bound to type A and H1 HBGAs-like substances; HuNoV GII.4 had different degrees of binding with type Lea, Leb, Lex, and Ley HBGAs-like substances, while HuNoV GI.5 had weak binding with type Leb HBGAs-like substances but significant advantage in binding with type H1 HBGAs-like substances. In summary, different types of HuNoV have different binding characteristics with HBGAs or HBGAs-like

收稿日期: 2023-03-29

基金项目: “十三五”国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项(2019YFD0901702); 山东省博士后创新项目(202103071); 2020年度烟台市蓝色产业领军人才团队项目; 中国水产科学研究院基本科研业务费资助项目(2023TD72)

第一作者简介: 佟利惠(1995—)(ORCID: 0000-0002-3384-5398), 女, 助教, 硕士, 研究方向为水产品质量与安全控制。  
E-mail: tonglihui1110@163.com

\*通信作者简介: 杨敏(1989—)(ORCID: 0000-0003-3908-0127), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向为海洋微生物工程。  
E-mail: minyang89@163.com

substances. Specifically, HuNoV GII.4 shows broad-spectrum binding characteristics whereas HuNoV GI.5 shows selective binding characteristics.

**Keywords:** human norovirus; P protein; Pacific oyster; histo-blood group antigens; binding characteristics

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230329-284

中图分类号: TS254.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 02-0113-07

引文格式:

佟利惠, 杨敏, 王珊珊, 等. GI.5和GII.4诺如病毒P蛋白的克隆表达及与长牡蛎类HBGAs的结合特性[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 113-119. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230329-284. <http://www.spkx.net.cn>

TONG Lihui, YANG Min, WANG Shanshan, et al. Cloning and expression of human norovirus GI.5 and GII.4 P proteins and their binding characteristics with histo-blood group antigens-like substances in Pacific oysters[J]. Food Science, 2024, 45(2): 113-119. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230329-284. <http://www.spkx.net.cn>

诺如病毒 (norovirus, NoV) 是引起非细菌性急性胃肠炎的主要病原体, NoV传染性极强, 少至10个病毒粒子就可引起感染风险<sup>[1]</sup>, 冬、春季节是NoV疫情高发期, 被感染者主要表现为发热、恶心、呕吐、腹痛和腹泻<sup>[2-5]</sup>。目前已发现NoV可分为10个基因簇 (GI~GX)<sup>[6-7]</sup>, 其中GI、GII、GVIII和GIV可感染人类, 被称为人诺如病毒 (human norovirus, HuNoV), GI和GII在我国范围内检出率较高<sup>[8-11]</sup>。HuNoV常通过被污染的环境、水源及水产品 (尤其是牡蛎等贝类) 感染人类, 引起急性胃肠炎疫情暴发。牡蛎是滤食性动物, 可以通过自身的滤食作用从被污染的海水中富集HuNoV<sup>[2]</sup>, 牡蛎体内的HuNoV浓度可达周围环境中的数十甚至上百倍, 且很难通过自身代谢或净化排出体外<sup>[12-13]</sup>。

HuNoV衣壳的结构蛋白主要由VP1组成, VP1可进一步分为形成内壳的壳 (S) 结构域和构成病毒拱形突起结构的突起 (P) 结构域<sup>[14]</sup>, P结构域是与组织血型抗原 (histo-blood group antigens, HBGAs) 受体结合的功能区<sup>[15-17]</sup>。HBGAs是与糖蛋白或糖脂相连的复杂碳水化合物, 多存在于红细胞和黏膜上皮细胞, HBGAs是通过不同糖基转移酶将不同单糖添加到二糖前体上产生, 主要分为为ABO型、Lewis型和分泌型<sup>[18-21]</sup>。不同基因型别HuNoV与不同类型HBGAs的识别具有多样性。近年来, 许多研究者也证实, 牡蛎组织中也存在类HBGAs, 且主要存在于牡蛎鳃和消化腺中, 以类A型和类H1型HBGAs居多, 这些类HBGAs在牡蛎富集HuNoV的过程中起到了重要作用<sup>[22-24]</sup>。Le Guyader等<sup>[25-26]</sup>发现体外表达的病毒P蛋白可以与长牡蛎组织中的类HBGAs特异性结合, 且不同型别病毒的结合特性存在差异。

由于HuNoV很难在体外培养, 而P蛋白是可以与HBGAs结合的功能蛋白, 且能稳定地在大肠杆菌中表达<sup>[27]</sup>, 所以可在一定程度上替代HuNoV进行科学研究。本研究运用大肠杆菌表达系统, 克隆表达GI.5和GII.4 HuNoV P蛋白, 探究两种基因型别HuNoV P蛋白与不同人类唾液样本的HBGAs、与牡蛎不同组织部位中的类

HBGAs的结合特性, 以期探明不同人群感染HuNoV以及长牡蛎富集HuNoV的规律性, 为HuNoV疫情高发期间消费者食用牡蛎的安全性提供预警。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

质粒提取试剂盒 (DP103)、基因纯化试剂盒 (DP204)、胶回收试剂盒 (DP219)、BCA蛋白浓度试剂盒 (PA115) 天根生化 (北京) 有限公司; 四甲基联苯胺 (tetramethylbenzidine, TMB) (54827-17-7) 北京索莱宝科技有限公司; 反转录试剂盒 (R212)、聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 高保真酶 (P510) 南京诺唯赞有限公司; Fast Digest *Nde*I (ER0581)、*Xba*I (ER0682) 美国Thermo公司; Ni-NTA琼脂糖凝胶 (31103) 德国Cube Biotech公司; 大肠杆菌感受态细胞DH5 $\alpha$ 、BL21 (DE3)、pET 28a质粒、兔多克隆抗体由本实验室保存; A (921902)、H (922102)、Lea (922202)、Leb (922302)、Lex (912901)、Ley (912501) 型HBGAs的单克隆抗体 (一抗) 美国Covance公司; 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记羊抗兔免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) G、IgM 天津三箭生物有限公司。

蛋白纯化buffer 1: 0.5 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液19 mL、0.5 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液81 mL、NaCl 29.3 g, 加水定容到1 000 mL, pH 7.4; buffer 2: 0.5 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液19 mL、0.5 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液81 mL、NaCl 29.3 g、咪唑34 g, 加水定容到1 000 mL, pH 7.4; buffer 3: 咪唑终浓度20 mmol/L溶液 (buffer 1 96 mL、buffer 2 4 mL), 咪唑终浓度250 mmol/L溶液 (buffer 1 50 mL、buffer 2 50 mL)。

病毒样本: 本研究所用阳性HuNoV毒株由疾病预防控制中心提供, 经全基因组测序验证为GI.5 V125株 (GenBank: MZ021630.1) 和GII.4 Sydney株 (GenBank: KR131784.1)。

唾液样本：共采集唾液样16份，均来自本单位工作人员，用无菌水漱口3次后，再用10 mL无菌水入口分泌唾液，磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline, PBS）（pH 7.4）按1:1 000稀释唾液样品，移入离心管煮沸10 min，5 000×g离心10 min后冷冻保存。经HBGAs单抗（稀释1 000倍）鉴定型别，分为A型、B型、AB型和O型HBGAs各4份。

牡蛎及其提取液制备：牡蛎样品为成年龄、活力旺盛的活牡蛎，购买于威海乳山，取10只牡蛎于无菌条件下，取出牡蛎的鳃、消化腺、外套膜和闭壳肌组织。料液比1:3（g/mL）加入PBS（pH 7.4）溶液，用匀浆机在冰上匀浆2 min，-80℃保存或继续后续实验。匀浆液置于95℃水浴中10 min，4℃、3 000×g离心10 min，取上清液，用BCA蛋白浓度试剂盒测定不同组织上清液中蛋白浓度。

## 1.2 仪器与设备

凝胶成像系统 上海Tanon科技有限公司；HB-100恒温金属浴、PCR仪 杭州博日科技有限公司；Nanodrop 2000微量核酸定量仪、D-37520台式高速冷冻离心机 美国Thermo公司；CT-2000高压灭菌锅 天津市超拓科贸有限公司；垂直板式电泳仪和水平电泳仪 北京六一生物科技有限公司；恒温摇床 天津欧诺仪器股份有限公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 P蛋白重组质粒的构建

#### 1.3.1.1 P蛋白基因的PCR扩增

利用在线软件NEBcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>)分析目的基因序列的限制性内切酶位点，根据pET28a质粒的多克隆位点，选择目的基因没有而质粒多克隆位点处有的限制性内切酶，设计5'-端带有限制性内切酶位点的引物进行扩增。引物如下（下划线代表酶切位点，酶切位点前是保护碱基）：GI.5-F：GGAA TTCCATATGCATATGGAAAACCTGTATTT、GI.5-R：GCTCTAGACTCGAGTTATCTTCTGACTC；GII.4-F：GGAATTCATATGATGAAGATGGCGTCGAGT、GII.4-R：GCTCTAGATTATACTGCACGTCTACGC。

根据病毒RNA提取试剂盒说明提取病毒RNA。将提取的RNA进行反转录，首先取10 pg~5 μg RNA模板进行预变性，加入RNase-free ddH<sub>2</sub>O至10 μL，于65℃加热5 min，迅速于冰浴上静置2 min。反转录体系：10 μL预变性RNA混合液、2 μL 10×RT Mix、2 μL HiScript III Enzyme Mix、1 μL Oligo (dT)20 VN、5 μL RNase-free ddH<sub>2</sub>O。反应条件：25℃退火5 min、50℃延伸45 min、85℃终止反应2 min。以cDNA为模板，用高保真酶扩增目的基因，扩增体系（50 μL体系）：10 μL 5×PrimerSTAR Buffer (Mg<sup>2+</sup>Plus)、4 μL

dNTP Mixture（各2.5 mmol/L）、1 μL Forward Primer（10 μmol/L）、1 μL Reverse Primer（10 μmol/L）、cDNA模板<200 ng、0.5 μL PrimerSTAR HS DNA Polymerase（2.5 U/μL）、加ddH<sub>2</sub>O补足至50 μL。扩增条件：95℃预变性3 min（1个循环），95℃变性15 s、56℃退火15 s、72℃延伸60 s（30个循环），72℃延伸5 min（1个循环）。用1%琼脂糖凝胶验证扩增是否成功，电泳的上样量为5 μL，电压为100 V，时间为20 min，用凝胶成像仪观察电泳条带，并与预测长度比对。

#### 1.3.1.2 重组质粒的构建

在50 μL双酶切体系中加入限制性内切酶NdeI和XbaI各2 μL、5 μL 10×Buffer、40 μL 1.3.1.1节中扩增成功的病毒DNA模板，用ddH<sub>2</sub>O补足至50 μL，在37℃金属浴中反应3~5 h，80℃灭酶20 min。酶切结束后根据胶回收试剂盒说明书对目的条带进行切胶回收。将胶回收的质粒和P蛋白基因连接，在20 μL的体系中加入5 μL质粒、10 μL P蛋白基因、2 μL 10×Buffer、1 μL T4 DNA Liagase、2 μL ddH<sub>2</sub>O，在16℃金属浴中过夜反应。

#### 1.3.1.3 重组DNA导入宿主细胞和重组子鉴定

取10 μL连接体系加入100 μL感受态细胞BL21（BE3）中，用热激法将重组质粒转化入感受态细胞中，37℃振荡培养1 h（180 r/min）。取100 μL菌悬液涂布于带有卡那霉素（kanamycin, Kan）（终质量浓度100 μg/mL）的LB平板上，37℃过夜培养。挑选上述平板中的菌落进行PCR验证，其中上游引物选择质粒本身的一段序列（通用引物T7：5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'），下游引物选择目的基因的下游引物。将扩增得到的目的条带送样测序（委托北京睿博兴科生物技术有限公司完成）。将测序结果与原序列进行比对以验证重组质粒是否成功导入宿主细胞。

#### 1.3.2 P蛋白的表达

选取1.3.1.3节阳性重组菌接种至含Kan（终质量浓度100 μg/mL）的LB培养基中，37℃、160 r/min振荡培养12~16 h。取2%种子液接种到含Kan（终质量浓度100 μg/mL）的LB培养基中，在37℃、160 r/min水平摇床中振荡培养2 h，再添加终浓度0.2 mmol/L的异丙基硫代半乳糖苷（isopropyl β-D-thiogalactoside, IPTG），于20℃、150 r/min水平摇床中继续培养至24 h。将发酵液于4℃、10 000 r/min离心10 min，分别收集上清液和细胞沉淀。将细胞沉淀悬浮于和上清液等体积的0.2 mol/L、pH 7.0 PBS中，超声破碎细胞，将超声破碎细胞后的悬液于4℃、10 000 r/min离心10 min，收集上清液。

#### 1.3.3 P蛋白的纯化

将超声破碎液过0.22 μm滤膜，用Ni-NTA亲和层析柱（1.6 cm×5 cm）进行纯化。用5~10倍体积buffer 1

平衡柱子；取适量上清液分次上样，结合30 min；用2~5个柱体积含20 mmol/L咪唑的buffer 3冲洗柱子；用含250 mmol/L咪唑的buffer 3进行洗脱，收集洗脱峰。用12%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）检测纯化程度同时验证分子质量，电泳显示为单一条带的蛋白用BCA试剂盒检测蛋白浓度。

### 1.3.4 P蛋白与唾液HBGAs结合特性分析

将不同唾液标本用PBS（pH 7.4）按1:1 000稀释，煮沸10 min，4℃、3 000 r/min离心5 min，取100 μL包被96孔酶标板，以PBS作为阴性对照，4℃过夜。随后每孔用200 μL的5%脱脂奶粉在37℃封闭1 h。各孔用PBS-T洗涤3次。将P蛋白用2%脱脂奶粉稀释成0.5 μg/mL，每孔100 μL（阳性对照不加P蛋白），37℃孵育1 h，PBS-T洗涤5次。用2%脱脂奶粉将兔抗P蛋白多克隆血清稀释4 000倍，每孔100 μL，37℃孵育1 h，PBS-T洗涤5次。每孔加入HRP-羊抗兔IgG（1:3 000）100 μL，37℃孵育1 h，PBS-T洗涤5次。加入100 μL辣根酶的底物TMB溶液，避光室温放置15 min显色；加入100 μL 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应，酶标仪测OD<sub>450 nm</sub>。

### 1.3.5 P蛋白与长牡蛎类HBGAs结合特性分析

取已知HBGAs型别的100 μL（质量浓度为20~80 μg/mL）长牡蛎不同组织上清液加入酶标板中，同时取100 μL PBS作为阴性对照，每个样品做3组平行，4℃过夜；弃去残液，用PBS洗板3次；加入2%脱脂乳稀释的P蛋白（0.5~1.0 μg/mL），4℃过夜；用300 μL 10%的脱脂奶粉封闭，37℃孵育2 h，弃去封闭液，PBS洗板3次；加入100 μL稀释1 000~4 000倍的兔多抗血清或单克隆抗体，37℃孵育1 h，用0.1%的PBS-T洗涤3次；加入100 μL稀释1 000~2 000倍HRP标记的羊抗兔二抗，37℃孵育1 h，PBS-T洗涤3次并拍干；加入100 μLHRP的底物TMB溶液，室温避光15 min；加入100 μL 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液终止反应，酶标仪测OD<sub>450 nm</sub>。

## 1.4 数据处理

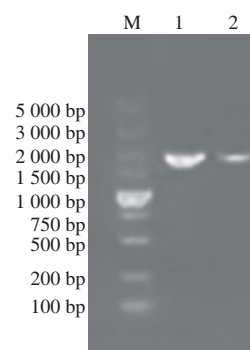
所有实验样本均平行测定3次，采用Excel和Graphpad Prism 8软件进行数据分析并作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 P蛋白的克隆表达

PCR电泳验证扩增得到P蛋白目的基因，结果见图1。可以看出，两条目的基因的条带大小约为

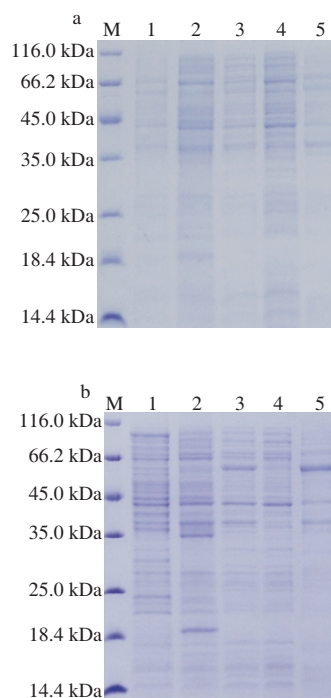
1 700 bp，与预测的基因大小相符，表明扩增成功。将扩增的基因通过大肠杆菌表达系统表达得到粗蛋白，蛋白的SDS-PAGE见图2。



M. Marker; 1. GL5; 2. GIL4.

图1 P蛋白基因PCR产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electropherograms of PCR products of the P protein gene



M.蛋白Marker，下同；1.空pET28a质粒；2.未诱导；3.经IPTG诱导；4.经IPTG诱导上清液；5.细胞沉淀。

图2 GL5 (a) 和GIL4 (b) P蛋白的SDS-PAGE图

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expressed P proteins of GL5 (a) and GIL4 (b)

### 2.2 P蛋白的纯化

表达的P蛋白均含His6标签，可与Ni离子结合，故采用Ni-NTA琼脂糖凝胶进行纯化。纯化后的蛋白进行SDS-PAGE，如图3所示，分子质量约为61 kDa，与预测分子质量一致，对照物BSA条带清晰可见，且与其分子质量（66.4 kDa）一致，说明结果可信。

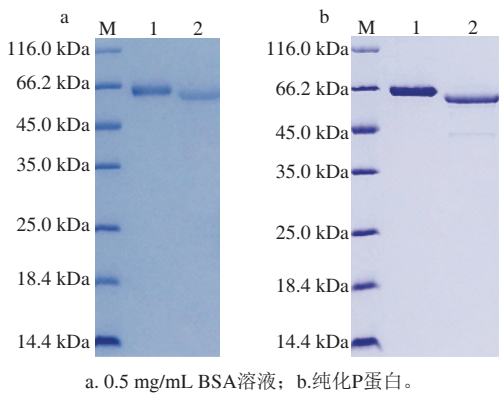


图3 GI.5 (a) 和 GII.4 (b) P 蛋白的纯化 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified P proteins of GI.5 (a) and GII.4 (b)

### 2.3 P 蛋白与唾液 HBGAs 结合模式分析

利用来自不同个体表型明确的 16 份唾液样本，研究 GI.5 和 GII.4 HuNoV P 蛋白与 HBGAs 的结合模式（阴性对照和阳性对照的  $OD_{450\text{ nm}} < 0.1$ ，说明无假阴性和假阳性发生），如图 4 所示， GII.4 HuNoV P 蛋白可与 A 型、B 型、AB 型和 O 型 HBGAs 不同程度结合，其中，与 O 型结合程度（>78.7%）最强，其次是与 A 型和 AB 型（65.3%~90.7%），与 B 型结合程度（50.7%~68.0%）最弱，这种广谱结合特性也是 GII.4 HuNoV 流行性强的原因。这一结合特性与其他 GII 型 HuNoV，如 GII.17、 GII.13、 GII.26 的结合特性一致<sup>[28-30]</sup>，但 GII.17 与 O 型 HBGAs 的结合强度稍弱。 GI.5 HuNoV P 蛋白可与 A 型、 AB 型和 O 型 HBGAs 不同程度结合，且与 O 型 HBGAs 结合程度（>85.7%）最强，与 A 型和 AB 型 HBGAs 结合的程度（31.9%~45.1%）低于 GII.4 HuNoV，与 B 型 HBGAs 几乎不结合。已有研究表明， GI.1、 GI.3 和 GI.5 HuNoV 与 O 型 HBGAs 有明显的结合优势，但不同的 GI 型 HuNoV 与 A、 B 和 AB 型 HBGAs 具有不同的结合模式<sup>[8]</sup>。

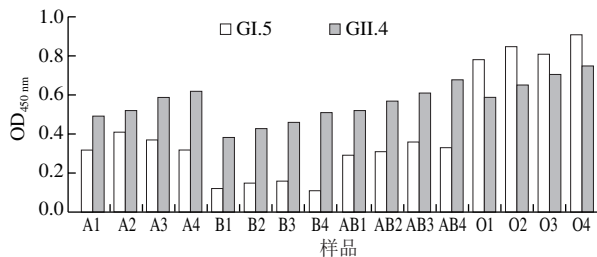


图4 GI.5和 GII.4 型 HuNoV P 蛋白与 16 份唾液结合模式分析

Fig. 4 Binding modes analysis of HuNoV P proteins to salivary HBGAs from 16 individuals with different blood types

### 2.4 P 蛋白与长牡蛎类 HBGAs 结合模式分析

利用来自牡蛎不同组织的提取液，研究 HuNoV P 蛋白与类 HBGAs 结合模式。从图 5 可以看出，两种 HuNoV

均不能与闭壳肌提取液结合，推测牡蛎闭壳肌中可能没有可以与 GI.5 和 GII.4 型 HuNoV 结合的类 HBGAs。 GII.4 HuNoV 可不同程度地与鳃、消化腺和外套膜提取液结合，且在消化腺中富集量最大，这与 GII 型 HuNoV 能够在牡蛎鳃、消化腺和外套膜中富集的报道一致<sup>[31]</sup>。 GI.5 HuNoV 与牡蛎消化腺组织提取液结合程度高于 GII.4 HuNoV 与消化腺的结合程度，而与鳃和外套膜的结合程度低于 GII.4 HuNoV 与鳃和外套膜的结合程度。已有研究表明， HuNoV 在牡蛎各组织的富集程度与 HuNoV 的型别有关， GI 型 HuNoV 易在牡蛎消化腺中富集，且 GI 型 HuNoV 的富集持久性高于 GII 型<sup>[2]</sup>，表明消化腺组织中含有易与 HuNoV 结合的类 HBGAs。

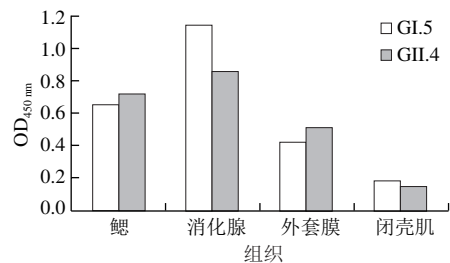


图5 HuNoV P 蛋白与牡蛎不同组织提取液的结合模式分析

Fig. 5 Binding modes analysis of HuNoV P proteins to extracts from different tissues of oysters

为研究 GI.5 和 GII.4 型 HuNoV 与哪种型别的 HBGAs 结合，提取了牡蛎的消化腺组织，根据研究室前期的研究，长牡蛎消化腺组织中含有 6 种类 HBGAs，包括 A、 H1、 Lea、 Leb、 Lex 和 Ley<sup>[32]</sup>，故用不同型别 HBGAs 所对应的单克隆抗体研究 HuNoV 与 HBGAs 的结合模式，结果如图 6 所示， GI.5 和 GII.4 HuNoV P 蛋白主要与类 A 型和 H1 型 HBGAs 结合，其次是类 Ley 型，与类 Lea 和 Lex 型 HBGAs 的结合程度较弱，与类 Leb 型 HBGAs 结合程度最弱。该研究结果与之前报道的 GII.4 HuNoV 变异株与 A 型和 H1 型 HBGAs 具有结合优势的结果一致<sup>[33]</sup>。此外， GI.5 HuNoV P 蛋白与类 H1 型 HBGAs 结合具有明显优势。

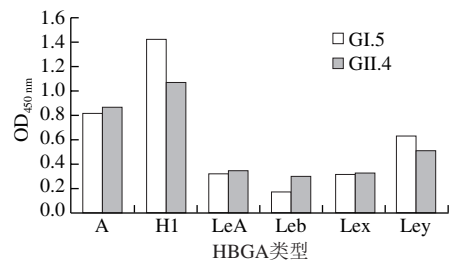


图6 HuNoV P 蛋白与长牡蛎消化道类 HBGAs 结合模式分析

Fig. 6 Binding pattern analysis of HuNoV P proteins to HBGA-like substances in digestive gland of oysters

已有研究表明, GI.1 HuNoV与类A型、H1型和Leb型HBGAs结合, GII.17 HuNoV与类A型、H1型HBGAs的结合程度较弱<sup>[34]</sup>, 而本研究的GI.5 HuNoV与类Leb型HBGAs结合微弱, GII.4 HuNoV与6种类HBGAs都具有结合特性, 表明不同型别的HuNoV与类HBGAs具有不同的结合特性。本研究的GI.5和GII.4 HuNoV与类A型和H1型HBGAs具有明显的结合优势, 这与HuNoV的胁迫会导致类A型和类H1型HBGAs的表达量显著上调的研究结果对应<sup>[32]</sup>。

### 3 结论

牡蛎是HuNoV传播的重要载体, 牡蛎的滤食特性使其易富集环境中的HuNoV, 牡蛎组织内的类HBGAs增加了病毒富集的持久性, 不同型别HuNoV与不同类HBGAs的结合模式不尽相同。本研究对比研究了流行株GI.5 HuNoV和GII.4 HuNoV与唾液HBGAs和长牡蛎类HBGAs的结合特性。结果表明, GII.4 HuNoV与唾液HBGAs具有广谱结合特性, 与A型、B型、AB型和O型HBGAs均具有较好的结合特性, 而GI.5 HuNoV与O型HBGAs的结合最强, 其次是A型和AB型, 与B型HBGAs的结合最弱。GI.5和GII.4 HuNoV主要富集在牡蛎消化腺中, 且主要与类A型、H1型和Ley型HBGAs结合, GII.4 HuNoV与类Leb型HBGAs有弱结合, 而GI.5 HuNoV与类Leb型HBGAs几乎不结合, 表明不同型别的HuNoV与类HBGAs的结合特性不尽相同。本研究明确了HuNoV与HBGAs的结合模式, 丰富了长牡蛎富集HuNoV的机制, 探明了不同人群感染HuNoV的规律性。后续研究可从减少牡蛎类HBGAs的表达方面入手, 减少HuNoV在牡蛎体内的富集, 提高牡蛎的食用安全性, 为人类健康保驾护航。

### 参考文献:

- [1] TEUNIS P F, MOE C L, LIU P, et al. Norwalk virus: how infectious is it?[J]. *Journal of Medical Virology*, 2008, 80(8): 1468-1476. DOI:10.1002/jmv.21237.
- [2] YANG M, ZHAO F, TONG L H, et al. Contamination, bioaccumulation mechanism, detection, and control of human norovirus in bivalve shellfish: a review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(32): 8972-8985. DOI:10.1080/10408398.2021.1937510.
- [3] 赵峰, 佟利惠, 杨敏, 等. 牡蛎中诺如病毒的感染及其防控研究进展[J]. *南方水产科学*, 2021, 17(4): 133-140. DOI:10.12131/20210042.
- [4] 苏来金, 马丽萍, 刘慧, 等. 人工污染GII.4型诺如病毒在太平洋牡蛎中的蓄积与分布特性[J]. *食品科学*, 2018, 39(23): 16-21. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201823003.
- [5] LUCERO Y, MATSON D O, ASHKENAZI S, et al. Norovirus: facts and reflections from past, present, and future[J]. *Viruses*, 2021, 13(12): 2399. DOI:10.3390/v13122399.
- [6] CHHABRA P, DE GRAAF M, PARRA G I, et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes[J]. *The Journal of General Virology*, 2019, 100(10): 1393-1406. DOI:10.1099/jgv.0.001318.
- [7] TATUSOV R L, CHHABRA P, DIEZ-VALCARCE M, et al. Human calicivirus typing tool: a web-based tool for genotyping human norovirus and sapovirus sequences[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2021, 134: 104718. DOI:10.1016/j.jcv.2020.104718.
- [8] 苏来金. 诺如病毒在贝类中的分布及与牡蛎类组织血型抗原结合机制研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019: 6-8.
- [9] 王美欢, 郭莉敏, 凌水权. 一起幼儿园诺如病毒感染性腹泻暴发调查[J]. *寄生虫病与感染性疾病*, 2020, 18(1): 41-44. DOI:CNKI:SUN:SJCB.0.2020-01-009.
- [10] WANG X S, WEI Z Q, GUO J Y, et al. Norovirus activity and genotypes in sporadic acute diarrhea in children in Shanghai during 2014-2018[J]. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2019, 38(11): 1085-1089. DOI:10.1097/INF.0000000000002456.
- [11] WEI N, GE J, TAN C Y, et al. Epidemiology and evolution of norovirus in China[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2021, 17(11): 4553-4566. DOI:10.1080/21645515.2021.1961465.
- [12] WESTRELL T, DUSCH V, ETHELBERG S, et al. Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010[J]. *Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 2010, 15(12): 19524.
- [13] BURKHARDT W, CALCI K R. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1375-1378. DOI:10.1128/AEM.66.4.1375-1378.2000.
- [14] PRASAD B V V, HARDY M E, DOKLAND T, et al. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid[J]. *Science*, 1999, 286(5438): 287-290. DOI:10.1126/science.286.5438.287.
- [15] TAN M, HUANG P W, MELLER J, et al. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket[J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(23): 12562-12571. DOI:10.1128/jvi.77.23.12562-12571.2003.
- [16] TAN M, HUANG P W, XIA M, et al. Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(2): 753-764. DOI:10.1128/JVI.01835-10.
- [17] CHEN Y L, HUANG C T. Establishment of a two-step purification scheme for tag-free recombinant Taiwan native norovirus P and VP1 proteins[J]. *Journal of Chromatography B*, 2020, 1159: 122357. DOI:10.1016/j.jchromb.2020.122357.
- [18] 马丽萍. 贝类中诺如病毒的风险评估及与组织血型抗原相关性[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013: 9-12.
- [19] CONG X, LI H B, SUN X M, et al. Functional and structural characterization of norovirus GII.6 in recognizing histo-blood group antigens[J]. *Virologica Sinica*, 2023, 38(1): 56-65. DOI:10.1016/j.virs.2022.09.010.
- [20] DULFER J, YAN H, BRODMERKEL M N, et al. Glycan-induced protein dynamics in human norovirus P dimers depend on virus strain and deamidation status[J]. *Molecules*, 2021, 26(8): 2125. DOI:10.3390/molecules26082125.
- [21] GAO J S, ZUO Y T, 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. DOI:10.3390/pathogens10080986.
- [22] GORJI M E, TAN M T H, LI D. Influence of fucosidase-producing bifidobacteria on the HBGA antigenicity of oyster digestive tissue and the associated norovirus binding[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2021, 340: 109058. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109058.
- [23] 刘萌, 刘慧, 赵峰, 等. 溶氧量及pH对太平洋牡蛎类A型组织血型抗原表达的影响研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(8): 2120-2126.
- [24] ZHANG D S, HUANG P W, ZOU L, et al. Tulane virus recognizes the A type 3 and B histo-blood group antigens[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(2): 1419-1427. DOI:10.1128/JVI.02595-14.
- [25] LE GUYADER F S, KROL J, AMBERT-BALAY K, et al. Comprehensive analysis of a norovirus-associated gastroenteritis outbreak, from the environment to the consumer[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(3): 915-920. DOI:10.1128/JCM.01664-09.
- [26] LE GUYADER F S, PARNAUDEAU S, SCHAEFFER J, et al. Detection and quantification of noroviruses in shellfish[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(3): 618-624. DOI:10.1128/aem.01507-08.
- [27] PHILIP A A, PATTON J T. Generation of recombinant rotaviruses expressing human norovirus capsid proteins[J]. *Journal of Virology*, 2022, 96(22): e01262-22. DOI:10.1128/jvi.01262-22.
- [28] 丛鑫, 李涵博, 王鹏飞, 等. 诺如病毒GII.13P蛋白的糖结合特征[J]. *中国生物制品学杂志*, 2019, 32(3): 261-264. DOI:CNKI:SUN:SWZP.0.2019-03-003.
- [29] 李涵博, 丛鑫, 段招军. GII.26型诺如病毒的组织血型抗原结合特征[J]. *病毒学报*, 2021, 37(6): 1310-1316. DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.004043.
- [30] MALM M, TAMMINEN K, VESIKARI T, et al. Norovirus GII.17 virus-like particles bind to different histo-blood group antigens and cross-react with genogroup II-specific mouse sera[J]. *Viral Immunology*, 2018, 31(10): 649-657. DOI:10.1089/vim.2018.0115.
- [31] LOWMOUNG T, POMBUBPA K, DUANGDEE T, et al. Distribution of naturally occurring norovirus genogroups I, II, and IV in oyster tissues[J]. *Food and Environmental Virology*, 2017, 9: 415-422. DOI:10.1007/s12560-017-9305-5.
- [32] SU L J, MA L P, LIU H, et al. Presence and distribution of histo-blood group antigens in Pacific oysters and the effects of exposure to noroviruses GI.3 and GII.4 on their expression[J]. *Journal of Food Protection*, 2018, 81(11): 1783-1790. DOI:10.4315/0362-028X.JFP-18-074.
- [33] MA L P, LIU H, SU L J, et al. Histo-blood group antigens in *Crassostrea gigas* and binding profiles with GII.4 norovirus[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2018, 36(4): 1383-1391. DOI:10.1007/s00343-018-7024-x.
- [34] MOROZOV V, HANISCH F G, WEGNER K M, et al. Pandemic GII.4 Sydney and epidemic GII.17 Kawasaki308 noroviruses display distinct specificities for histo-blood group antigens leading to different transmission vector dynamics in Pacific oysters[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2826. DOI:10.3389/fmicb.2018.02826.