

介导分泌表达猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的 重组杆状病毒的构建

张春雷, 靳立明, 叶 昱, 张 杰, 朱 俊, 高又文, 廖 明, 樊惠英
(华南农业大学 兽医学院, 农业部兽用疫苗创制重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:应用杆状病毒表达系统,将猪圆环病毒 2 型 *ORF2* 基因插入供体质粒 pFastBac™ Dual pH 启动子控制下的多克隆位点,引入 EGT 信号肽取代 *ORF2* 原有核定位信号肽以实现在昆虫细胞中分泌型表达,并在 C 端融合 6 个组氨酸标签以便于后期的纯化. 将构建质粒转化 DH10Bac 感受态细胞获得重组穿梭载体,提取重组 Bacmid 质粒. 将阳性重组 Bacmid 质粒转染 Sf9 昆虫细胞,72 h 收集培养上清液获得重组杆状病毒. 间接免疫荧光试验和 Western-blot 表明,该重组杆状病毒可以在昆虫细胞实现猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的分泌表达.

关键词:猪圆环病毒 2 型; *ORF2* 基因; EGT 信号肽; Cap 蛋白; 重组杆状病毒
中图分类号:S852.65 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2013)04-0564-05

Construction of a Recombinant Baculovirus Secreted Expression Vector in Cap Protein of Porcine Circovirus Type 2

ZHANG Chunlei, JIN Liming, YE Yu, ZHANG Jie, ZHU Jun, GAO Youwen, LIAO Ming, FAN Huiying
(Key Laboratory of Veterinary Vaccine Development, Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine,
South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:The objective of this study was to utilize baculovirus expression vector system to express capsid (Cap)protein (in secreted form)of porcine circovirus 2. The gene sequences encoding Cap protein fused with a C-terminal 6 Histidine tag were cloned into the baculovirus pFastBac™ Dual vector under the control of pH promoter. The authentic signal peptide of porcine circovirus type 2 *ORF2* was substituted with the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (EGT) signal peptide. Plasmid was transformed into *Escherichia coli* DH10Bac competent cells to obtain the recombinant shuttle vector Bacmid. The Bacmid was transfected into Sf9 cells to produce the recombinant baculovirus. Indirect immunofluorescent assay and Western-blot indicated that the recombinant baculovirus could express Cap protein in infected Sf9 cells.

Key words:porcine circovirus 2; *ORF2* gene; EGT signal peptide; Cap protein; recombinant baculovirus

当前,猪圆环病毒 2 型(Porcine circovirus type 2, PCV 2)是严重危害世界养猪业的病原之一^[1]. 该病毒与猪的多种疾病综合征有关,特别是断乳仔猪多系统衰竭综合征(Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS),还可导致猪呼吸道病综合征(Porcine respiratory disease complex, PRDC)、猪皮炎/肾病综合征(Porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNA)等相关疾病^[2-4]. 该病最早于 1991 年在加拿大发现,其临床症状主要表现为呼吸道症状、进行性消瘦、苍白发热及黄疸等. PCV2 主要侵害机

体的免疫系统,导致免疫抑制,造成继发感染,在猪群中感染率非常高,给养猪业造成巨大的经济损失^[5-6].

PCV2 基因组为单股负链环状 DNA,基因组全长 1 767 或 1 768 bp,共编码 11 个开放阅读框架(Open reading frames,ORFs),其中功能上以 ORF1 和 ORF2 最为重要. ORF1 编码与病毒 DNA 滚环复制相关的蛋白(Rep)^[7];ORF2 编码病毒的结构蛋白(Cap),构成病毒的核衣壳,是病毒的主要免疫原性蛋白^[8-9],所以关于 PCV2 基因工程疫苗和诊断试剂盒的研究,都主要集中在 PCV2 Cap 蛋白上.

华南农业大学农业部兽用疫苗创制重点实验室曾利用杆状病毒表达系统(Baculovirus expression vector system, BEVS)表达 PCV2 Cap 蛋白,但重组 Cap 蛋白在 Sf9 昆虫细胞中以包涵体形式存在,而非其天然活性状态,不利于其抗原表位的展示,导致该蛋白的免疫原性不强,也不利于该蛋白的后期纯化. 因此,本研究拟通过引入 EGT 分泌型信号肽取代 ORF2 原有核定位信号肽(NLS)以达到 Cap 蛋白分泌出细胞的目的,并在 ORF2 C 端融合 6 个组氨酸标签以便于后期的纯化,从而产生具有天然结构和更高免疫活性的重组 Cap 蛋白,为 PCV2 基因工程疫苗的研究提供新的选择.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株、菌种和细胞 PCV2 毒株、Sf9 昆虫细胞、大肠埃希菌 DH5 α 、DH10Bac 菌株均由华南农业大学农业部兽用疫苗创制重点实验室保存, pFast-BacTM Dual 为 Invitrogen 公司产品.

1.1.2 主要试剂 ExTM TaqDNA 多聚酶、dNTP 为大连宝生物工程有限公司产品, T4DNA 连接酶和各种限制性内切酶等工具酶均为 NEB 公司产品, DNA 凝胶纯化试剂盒、质粒抽提试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品, 昆虫细胞培养基(Grace)和 LipofectamineTM2000 转染试剂为美国 Invitrogen 公司产品, 胎牛血清为奥地利 PAA 公司产品. 抗 PCV2 的阳性血清由华南农业大学农业部兽用疫苗创制重点实验室制备并保存, FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 为 Sigma 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 EGT 信号肽基因的扩增和鉴定 根据 EGT 基因序列设计引物, PCR 扩增 EGT 信号肽基因. P1: 5'-ACGC $\overline{GTCGACATGACTATTCTCTGCTGGCTTGCACTGCTGTCTACGCTTACTGCT}$ -3', P2: 5'-GTGTTGA-

AGATGCCATTGGCCGCATTTACAGCAGTAAGCGTA-GACAGCAG-3', P1 上游下划线部分为保护性碱基, 斜线部分为 Sal I 酶切位点, ATG 为起始密码子. 引物 P1 和 P2 之间有 21 个碱基互补, P1、P2 互为模板, 用 ExTM TaqDNA 多聚酶扩增 EGT 信号肽基因, 预计扩增长度为 84 bp. PCR 循环参数为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 进行 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. PCR 产物送上海英俊生物公司进行序列测定.

1.2.2 去除核定位信号肽 ORF2(dORF2)基因的扩增和鉴定 根据 PCV2 ORF2 序列设计 1 对特异性引物. P3: 5'-AATGGCATCTTCAACACCCGCCTCTCCCGC-3', P4: 5'-TGCTAAGCTTTTAGTGGTGATGATGGTGGTGAGGGTTAAAGTGGGGGGTCTTT-3'. 其中, 引物 P3 与 EGT 信号肽基因有 17 个碱基的互补, P4 中下划线部分为保护性碱基, 斜线部分为 Hind III 酶切位点, 波浪线部分为 6 个组氨酸编码序列. 以克隆载体 pMD18-T PCV2 为模板, 用 ExTM TaqDNA 多聚酶扩增 dORF2 基因, PCR 循环参数为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 进行 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 预计扩增长度为 607 bp, 扩增产物送上海英俊生物公司进行序列测定.

1.2.3 EGT 信号肽序列和 dORF2 序列的 PCR 融合

PCR 反应体系为 50 μL , 取经纯化的 EGT 信号肽和 dORF2 产物各 1.5 μL , 引物 P1 和 P4(20 pmol/L) 各 1 μL , dNTPs(2.5 mmol/L) 4 μL , 10 $\times$ Ex TaqTM Buffer 5 μL , Ex TaqTM DNA 聚合酶(5 U/ μL) 0.5 μL , 去离子水 35 μL . 用 ExTM TaqDNA 多聚酶进行 PCR 扩增, PCR 循环参数为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 进行 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 预计扩增长度为 674 bp, PCR 产物前端带有 salI 酶切位点, 后端带有 Hind III 酶切位点, 并有 6 个组氨酸(His)标签, 命名为 EGT-dORF2, 扩增产物送上海英俊生物公司进行序列测定.

1.2.4 重组转移载体 pFastBac-EGT-dORF2 的构建与鉴定 将扩增的片段 EGT-dORF2 进行胶回收纯化, 然后用限制性内切酶 Sal I 和 Hind III 进行酶切, 连接到经同样酶切消化的 pFastBacTM Dual 载体上, 转化 DH5 α 感受态细胞, 进行含氨苄抗性的平板筛选, 挑取阳性克隆进行摇菌扩增, 小量提取质粒, 用 Sal I 和 Hind III 进行酶切, 筛选得到阳性转移质粒 pFastBac-EGT-dORF2. 进行序列测定以验证插入序列的正确性.

1.2.5 重组穿梭载体 Bacmid-EGT-dORF2 的获得

将重组质粒 pFastBac-EGT-dORF2 转化 DH10Bac 感受态细胞,用三抗平板(Kan、Gen 和 Tet)进行蓝白斑筛选,纯化白色阳性菌落,提取 Bacmid 质粒,用 M13 通用引物鉴定穿梭质粒 Bacmid-EGT-dORF2.

1.2.6 重组杆状病毒 Bv-EGT-dORF2 的获得 提取纯化 Bacmid-EGT-dORF2,利用 Lipofectamine™ 2000 将 Bacmid-EGT-dORF2 转染 Sf9 昆虫细胞,于 27 ℃ 条件下培养,待出现细胞病变后,收集培养液上清液即获得了重组杆状病毒 Bv-EGT-dORF2,并利用昆虫细胞扩增种毒.

1.2.7 间接免疫荧光检测 Cap 蛋白的表达 用 24 孔板培养 Sf9 细胞至对数生长期时,接种重组杆状病毒 Bv-EGT-dORF2,27 ℃ 培养 72 h,至细胞出现病变时,弃培养上清液,收获细胞,用预冷的 PBS 洗涤 3 次,干燥后用预冷的丙酮-乙醇(体积比 3:2)固定液于-20 ℃ 条件固定 15 min,以 1:200 稀释的鼠抗 PCV2 抗体为一抗,1:100 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,荧光显微镜观察结果.

1.2.8 Western-blot 鉴定 Cap 蛋白的表达 收集感染 Bv-EGT-dORF2 的 Sf9 昆虫细胞,用适量 PBS 重悬,经适当处理后,进行 SDS-PAGE 电泳,电转移至 NC 膜,用 0.05 g/mL 脱脂奶粉封闭 2 h,PBST 洗涤后,一抗孵育过夜,再用 1:10 000 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 二抗孵育 1 h,经 Odyssey 双色红外激光成像系统扫描,并观察结果.

2 结果

2.1 EGT 信号肽和 dORF2 基因的连接结果

将含有 Sal I 酶切位点的编码 EGT 信号肽基因片段和含有 Hind III 酶切位点的 dORF2 片段进行 PCR 融合扩增,其产物用 0.01 g/mL 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,出现 674 bp 条带,与预期大小一致(图 1),测序结果表明无碱基突变.

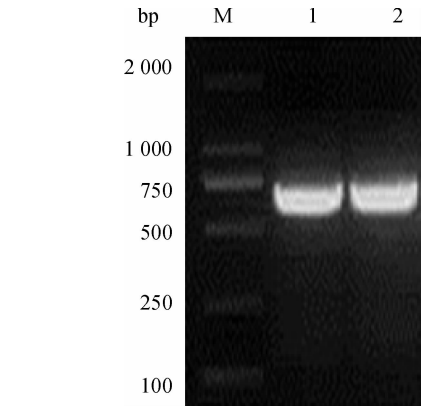
2.2 重组转移质粒 pFastBac-EGT-dORF2 的构建

对重组质粒 pFastBac-EGT-dORF2 分别进行 sal I 和 Hind III 单酶切和双酶切鉴定,单酶切消化后产生大小约为 5 200 bp 片段,双酶切后产生 4 500 和 670 bp 的 2 个片段,与预期大小一致(图 2). 并对 pFastBac-EGT-dORF2 进行测序,证实无碱基突变.

2.3 重组穿梭载体 Bacmid-EGT-dORF2 的 PCR 鉴定

将重组穿梭载体 Bacmid-EGT-dORF2 转化 DH10Bac 感受态细胞后,经蓝白斑筛选,挑取白斑进行菌液扩增,提取质粒用 M13 引物进行 PCR 鉴定,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,在 3 500 bp 处可见

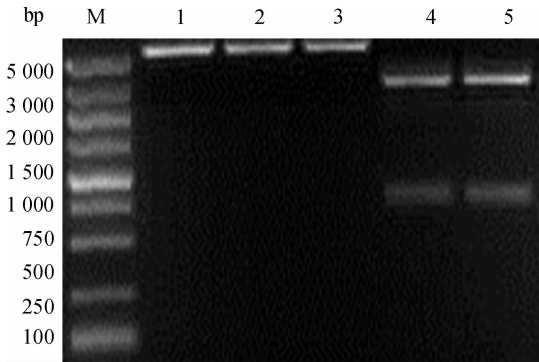
特异性条带,证明已成功获得重组 Bacmid-EGT-dORF2(图 3).



M:DNA marker DL 2000; 1,2: EGT-dORF2 的 PCR 产物.

图 1 EGT-dORF2 融合产物的 PCR 鉴定

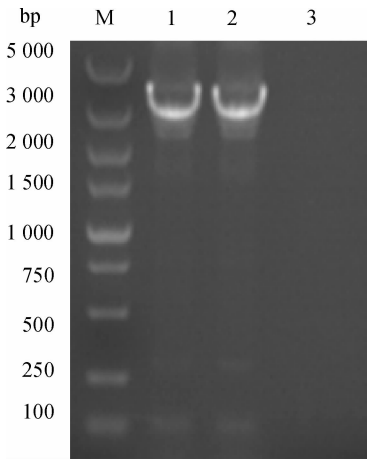
Fig. 1 Identification of the fused EGT-dORF2 by PCR



M:DNA marker DL 5000;1,2:重组转移质粒 pFastBac-EGT-dORF2 的 Sal I 单酶切产物;3:重组转移质粒 pFastBac-EGT-dORF2 的 Hind III 单酶切产物;4,5:重组转移质粒 pFastBac-EGT-dORF2 的 Sal I 和 Hind III 双酶切产物.

图 2 重组转移质粒 pFastBac-EGT-dORF2 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant vector pFastBac-EGT-dORF2



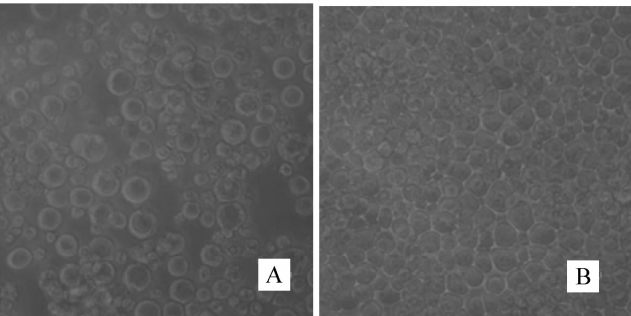
M:DNA marker DL 5000;1,2:重组穿梭载体 Bacmid-EGT-dORF2 的 PCR 扩增产物;3:以 ddH₂O 为模板的 PCR 对照.

图 3 重组穿梭载体 Bacmid-EGT-dORF2 的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant transfer vector Bacmid-EGT-dORF2 by PCR

2.4 重组杆状病毒 Bv-EGT-dORF2 的鉴定

利用脂质体转染法,将提取的重组穿梭载体 Bacmid-EGT-dORF2 转染 Sf9 细胞,于 27 ℃ 培养,72 h 出现细胞病变,主要表现为细胞变大、变圆、折光率增强、膨胀等(图 4)。

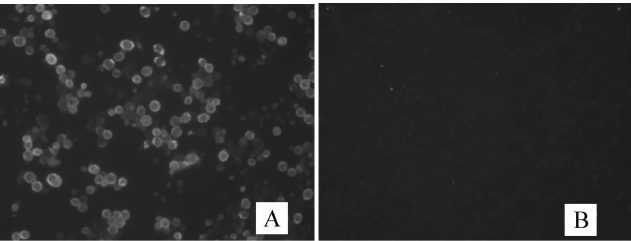


A: Bacmid-EGT-dORF2 转染 Sf9 细胞 (200 ×);B: 正常 Sf9 昆虫细胞对照 (200 ×)。

图 4 重组穿梭载体 Bacmid-EGT-dORF2 转染 Sf9 细胞
Fig. 4 Transfected insect cells by recombinant transfer vector Bacmid-EGT-dORF2

2.5 间接免疫荧光鉴定 Cap 蛋白的表达

重组杆状病毒感染 Sf9 细胞后,进行间接免疫荧光试验. 结果显示,重组杆状病毒 Bv-EGT-dORF2 感染 Sf9 细胞后,能够与抗 PCV2 血清发生特异性的免疫反应,发出特异性的免疫荧光,并且荧光信号主要分布在细胞膜上(图 A),而野毒感染组未出现任何荧光(图 B),表明重组杆状病毒成功表达 Cap 蛋白(图 5)。

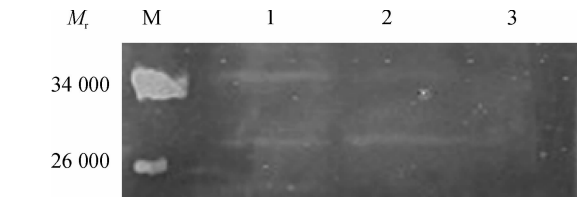


A:感染 Bacmid-EGT-dORF2 的 Sf9 昆虫细胞 (100 ×);B:野毒感染 Sf9 昆虫细胞 (100 ×)。

图 5 重组杆状病毒 Bv-EGT-dORF2 的间接免疫荧光实验
Fig. 5 Indirect immunofluorescence of the recombinant baculovirus Bv-EGT-dORF2

2.6 Western-blot 鉴定 Cap 蛋白的表达

Sf9 昆虫细胞感染 Bv-EGT-dORF2 后 72 h,收集细胞,进行 Western-blot 鉴定,在相对分子质量为 28 000 处出现特异性条带,而野生杆状病毒对照组则未出现条带. 表明重组杆状病毒能够在 Sf9 细胞表达具有生物活性的 Cap 蛋白(图 6)。



M:蛋白质相对分子质量标准;1,2:感染 Bv-EGT-dORF2 的 Sf9 昆虫细胞;3:感染野生杆状病毒的 Sf9 昆虫细胞。

图 6 重组杆状病毒 Bv-EGT-dORF2 的 Western-blot 鉴定
Fig. 6 Identification of recombinant baculovirus Bv-EGT-dORF2 by Western-blot

3 讨论

Cap 蛋白为 PCV2 的核衣壳蛋白,是该病毒唯一的结构蛋白,同时也是病毒主要的免疫原性蛋白,所以关于 PCV2 诊断和基因工程疫苗的研究,都集中在 Cap 蛋白上^[8-9]. Cap 蛋白的表达作为一个研究的热点,已在不同系统中获得表达. 陈春丽等^[10]利用 pCold-SUMO 原核表达系统实现了 Cap 蛋白的可溶性高效表达. 宋云峰等^[11]利用伪狂犬病毒作为载体,表达了 Cap 蛋白. 欧阳素贞等^[12]利用重组腺病毒载体成功表达了 Cap 蛋白. 樊惠英^[13]利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统表达了 PCV2 Cap 蛋白,并对所表达的重组 Cap 的亚细胞定位进行了研究. 王彦彬等^[14]、Yamaji 等^[15]和 Golden 等^[16]通过引入一些信号肽实现目的蛋白的分泌表达。

Cap 蛋白的 N 端 65aa ~ 87aa、113aa ~ 147aa、157aa ~ 183aa 区域为病毒的主要抗原位点^[17-18],其中 N 端 69 ~ 83aa 和 117aa ~ 131aa 抗原位点是型特异性的 PCV2 抗原位点,但由于 ORF2 基因编码的 N 端 41 个氨基酸为核定位信号肽^[19],不包含主要的抗原区域,但使得 Cap 蛋白定位于细胞核. 不利于其抗原表位的展示,导致该蛋白的免疫原性不强,也不利于该蛋白的后期纯化. 因此,本研究通过引入 EGT 分泌型信号肽取代 ORF2 原有核定位信号肽(NLS),构建了介导分泌表达 PCV2 Cap 的重组杆状病毒。

间接免疫荧光试验表明,被重组杆状病毒感染的 Sf9 昆虫细胞显示很强的荧光信号,并且其荧光主要分布在细胞膜上,表明重组蛋白是以分泌型的形式进行表达. 进一步对重组杆状病毒 Bv-EGT-dORF2 进行 Western-blot 鉴定,在相对分子质量 28 000 处出现特异性条带,而野生杆状病毒对照组则未出现条带,表明重组杆状病毒能够表达具有生物活性的 Cap 蛋白. 但是在 Sf9 培养上清液中未检测到 Cap 蛋白的表达,经过分析,其原因可能是由于 EGT 信号肽为外

源信号肽,而非来自 Sf9 细胞,因此,表达的 Cap 蛋白虽然可以通过 EGT 信号肽引导分泌到细胞外,但却不能被 Sf9 细胞所识别,不能被正确剪切掉,导致细胞培养上清液中的 Cap 蛋白很少,从而检测不到该蛋白的表达.这也与王彦彬等^[14]的研究结果一致.

同时,本研究在 Cap 蛋白的 C 端融合进去 6 个 His 标签,方便目的蛋白的后期纯化过程^[20].并对病毒感染后最佳收毒时间进行了筛选和优化,结果表明,感染后 72 h 时细胞病变最为明显,间接免疫荧光最亮,表明此时蛋白的表达量最高,时间过长会产生大量的细胞碎片,荧光反而会减弱.

本研究通过引入 EGT 分泌型信号肽,构建了介导分泌表达 Cap 蛋白的重组杆状病毒,成功实现了 PCV2 Cap 蛋白的表达,但未有效地分泌到上清液中,因此,我们下一步的工作将继续试用来源于 Sf9 细胞或者能被 Sf9 细胞所识别的信号肽,来提高细胞培养上清液中目的蛋白的表达量.

参考文献:

- [1] ALLAN G M, MEEHAN B, TODD D, et al. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes [J]. *Vet Rec*, 1998, 142(7): 467-468.
- [2] ALLAN G M, McNEILLY E, KENNEDY S, et al. PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990 [J]. *Vet Rec*, 2000, 146(24): 711-712.
- [3] KIM J, CHUNG H K, CHAE C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex [J]. *Vet J*, 2003, 166(3): 251-256.
- [4] RAMAMOORTHY S, MENG Xiangjin. Porcine circoviruses: A minuscule yet mammoth paradox [J]. *Anim Health Res Rev*, 2009, 10(1): 1-20.
- [5] 朗洪武, 张广川, 吴发权. 断奶猪多系统衰竭综合征血清抗体检测 [J]. *中国兽医科技*, 2000, 30(3): 3-5.
- [6] 张朝霞, 刘长明, 危艳武. 猪圆环病毒 2 型 ELISA 抗体检测试剂盒的研制及应用 [J]. *中国预防兽医学报*, 2008, 30(7): 548-578.
- [7] MANKERTZ A, MANKERTZ J, WOLF K, et al. Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus [J]. *J Gen Virol*, 1998, 79(2): 381-384.
- [8] NAWAGITGUL P, MOROZOV I, BOLIN S R, et al. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(9): 2281-2287.
- [9] LEKCHAROENSUK P, MOROZOV I, PAUL P S, et al. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1, PCV2 [J]. *J Virol*, 2004, 78(15): 8135-8145.
- [10] 陈春丽, 郭宇飞, 陈筱薇, 等. 利用 SUMO 系统高效表达可溶性的 PCV2 Cap 蛋白 [J]. *华南农业大学学报*, 2012, 33(3): 393-397.
- [11] 宋云峰, 肖少波, 曹胜波, 等. 猪 2 型圆环病毒 Cap 蛋白在伪狂犬病毒中的表达 [J]. *中国兽医学报*, 2007, 27(2): 155-158.
- [12] 欧阳素贞, 张福良, 王双山, 等. 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白重组腺病毒的构建及表达 [J]. *中国预防兽医学报*, 2008, 30(3): 165-168.
- [13] 樊惠英. 猪圆环病毒 2 型基因工程疫苗的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
- [14] 王彦彬, 崔保安, 陈红英, 等. 猪干扰素 α 在昆虫细胞中分泌表达及抗病毒活性检测 [J]. *中国农业科学*, 2009, 42(4): 1435-1441.
- [15] YAMAJI H, SEGAWA M, NAKAMURA M, et al. Production of Japanese encephalitis virus-like particles using the baculovirus-insect cell system [J]. *J Biosci Bioeng*, 2012, 114(6): 1-6.
- [16] GOLDEN A, AUSTEN D A, VAN SCHRAVENDIJK M R, et al. Effect of promoters and signal sequences on the production of secreted HIV-1 gp120 protein in the baculovirus system [J]. *Protein Expr Purif*, 1998, 14(1): 8-12.
- [17] LOU Zhongzi, LI Xuerui, LI Zhiyong, et al. Expression and antigenicity characterization for truncated capsid protein of porcine circovirus type 2 [J]. *Can J Vet Res*, 2011, 75(1): 61-64.
- [18] MAHE D, BLANCHARD P, TRUONG C. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(7): 1815-1824.
- [19] LIU Qiang, TIKOO S K, BABIUK L A. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2 [J]. *Virology*, 2001, 285(1): 91-99.
- [20] KOHO T, MÄNTYLÄ T, LAURINMÄKI P, et al. Purification of norovirus-like particles (VLPs) by ion exchange chromatography [J]. *J Virol Methods*, 2012, 181(1): 6-11.
- [21] COX M M. Recombinant protein vaccines produced in insect cells [J]. *Vaccine*, 2012, 30(10): 1759-1766.

【责任编辑 柴 焰】