

林而舒. 鳊圆环病毒衣壳蛋白的表达与鉴定 [J]. 福建农业学报, 2024, 39 (11): 1236–1241.

LIN E S. Expression and Characterization of Capsid Protein of Eel Circovirus [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2024, 39 (11): 1236–1241.

鳊圆环病毒衣壳蛋白的表达与鉴定

林而舒

(福建省淡水水产研究所, 福建 福州 350025)

摘要: 【目的】利用原核表达系统制备鳊圆环病毒 (Eel circovirus, EeCV) 的衣壳蛋白 (Cap 蛋白), 以期为 EeCV 亚单位疫苗及相关生物制品的制备奠定基础。【方法】以 EeCV Cap 蛋白基因组序列 (GenBank 登录号: NC_023421.1) 为参考, 优化其密码子并进行全序列合成。将合成序列克隆至 pET-32a 载体, 构建重组表达质粒 pET32a-EeCV-Cap, 并转化至表达宿主菌 BL21 (DE3) 中, 优化诱导表达温度和时间, 制备 EeCV Cap 重组蛋白。再利用 SDS-PAGE 与 Western blot 对 EeCV Cap 蛋白进行鉴定, 并通过透射电镜观察是否形成病毒样颗粒 (virus-like particles, VLPs)。【结果】重组质粒 pET32a-EeCV-Cap 在大肠埃希菌中表达为可溶性蛋白, 蛋白大小约为 31 kDa。且在 20 °C 使用 0.5 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导 16 h 时, EeCV Cap 重组蛋白表达量最高。超声破碎后的重组菌上清液经镍柱纯化可得到单一目的蛋白。经 Western blot 鉴定, 在 31 kDa 处有一条明显的特异性条带, 与预期大小符合。在透射电镜下可观察到, 经过戊二醛和 1% 锇酸固定的蛋白悬液里, 存在直径 20 nm 左右规则的 VLPs。【结论】本研究实现了 EeCV Cap 蛋白在大肠埃希菌中的可溶性表达, 经镍柱亲和层析法可得到单一目的蛋白, 并能在体外自发组装成 VLPs, 可用于制备亚单位疫苗及相关生物制品。

关键词: 鳊圆环病毒; 原核表达; 衣壳蛋白

中图分类号: S943

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2024) 11-1236-06

Expression and Characterization of Capsid Protein of Eel Circovirus

LIN Ershu

(Freshwater Fisheries Research Institute of Fujian Province, Fuzhou, Fujian 350025, China)

Abstract: 【Objective】The capsid protein (Cap) of Eel circovirus (EeCV) was prepared using a prokaryotic expression system for the development of an EeCV subunit vaccine and related biological products. 【Method】The genome sequence of EeCV-Cap (GenBank accession number: NC_023421.1) was used as the reference for codon optimization and plasmid synthesis. The Cap gene was amplified with designed specific primers and cloned into pET-32a vector to construct the pET32a-EeCV-Cap recombinant expression plasmid. EeCV-Cap recombinant protein was obtained by transforming the recombinant plasmid into the host bacterium BL21 (DE3) followed by an IPTG induction. Western blot was performed to confirm expression of the recombinant Cap. 【Result】The recombinant pET32a-EeCV-Cap was mainly expressed as a soluble protein in *E. coli*. A purified target protein was obtained using nickel affinity chromatography with the highest expression achieved with the final IPTG concentration of 0.5 mmol·L⁻¹ for the induction at 20 °C in 16 h. A single band with the calculated molecular weight of 31 kDa was detected by Western blot. Under a transmission electron microscope, the negative phosphotungstic acid-stained protein suspension showed numerous regular virus-like particles (VLPs) that were 20 nm in diameter. 【Conclusion】The solubility expression of EeCV-Cap in *E. coli* was realized in this study to visualize the VLPs. Using the modified nickel affinity chromatography, a single target protein was obtained that could spontaneously assemble into VLPs *in vitro* for the development of an EeCV subunit vaccine and related products.

Key words: Eel circovirus; prokaryotic expression; capsid protein

收稿日期: 2024-08-15 修回日期: 2024-10-10

作者简介: 林而舒 (1993—), 女, 硕士, 农艺师, 研究方向为水产病害, E-mail: linershu@qq.com

基金项目: 福建省科技计划公益类专项 (2023R1013003、2022R1014005)

0 引言

【研究意义】鳗鲡 (*Anguilla*) 是一种具有重要经济价值的洄游性鱼类, 其营养丰富、肉质鲜美^[1,2]。全球鳗鲡养殖产量的 70% 来自中国^[3]。但是随着养殖集约化程度的不断提高, 国内鳗鲡养殖病害情况也日趋严重^[4], 其中鳗鲡圆环病毒 (Eel circovirus, EeCV) 给养鳗业带来了巨大的经济损失^[5,6]。EeCV 为 12~26 nm 单链环状 DNA 病毒, 其病毒粒子衣壳仅由 1 种结构蛋白 (衣壳蛋白) 组成^[4]。自 2017 年以来, GenBank 中可查询到已完成全基因组序列的鳗鲡圆环病毒仅有 4 株, 分别为 NC_023421.1 (Ba 1 株)、KU951580.1 (AN 24 株)、KU951579.1 (AN 10 株) 和 KU951578.1 (AN 8 株)。鳗鲡圆环病毒毒株难以分离, 导致形态学结构及疫苗研发等工作无法深入开展。利用基因工程技术构建的病毒样颗粒 (virus-like particles, VLPs) 无需分离毒株即可揭示病毒的特征, 能够解决目前的难题^[7]。EeCV Cap 蛋白是 EeCV 的主要结构蛋白, 参与病毒附着过程, 且能引发宿主免疫反应。因此基于 EeCV VLPs 的研究具有理论指导意义和潜在应用价值。【前人研究进展】病毒样颗粒与真实病毒的构象极其相似, 但是其内部不含核酸, 所以不能进行复制也没有感染能力, 因而不存在病毒基因组交换重组、病毒未完全灭活、病毒返祖等潜在风险, 而且病毒结构蛋白可以在各种活体或无细胞的表达系统中进行组装和重建成类病毒结构^[8,9]。常见的 VLPs 有猪圆环病毒 2 型 VLPs^[10]、猪细小病毒 VLPs^[11]、II 型草鱼呼肠孤病毒 VLPs^[12]、神经坏死病毒 VLPs^[13], 表明利用基因工程手段制备 VLPs 的技术已经十分成熟。【本研究切入点】目前 EeCV 的研究主要集中在病毒检测方法和毒株分离方面, 关于 EeCV VLPs 的研究尚未见相关报道。【拟解决的关键问题】本研究克隆表达了 EeCV Cap 蛋白基因, 并通过透射电镜观察其体外自组装成 VLPs, 首次披露 EeCV 形状与大小, 也为研制 EeCV 亚单位疫苗和开发 EeCV 抗体检测试剂盒等奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

DL 12000 Maker、限制性核酸内切酶 *Bam* H I-*Xho* I 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、BL21 (DE3) 感受态细胞、pET-32a (+)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)、非

预染蛋白 Marker、预染蛋白 Marker、小鼠抗 6 $\times$ His Tag 单克隆抗体 (D191001)、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HBR) 标记山羊抗小鼠 IgG (D110087)、柱式 DNA 胶回收试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; Ni-NTA 镍柱预装柱购自美国通用电气公司; 二氨基联苯胺显色试剂盒 (DA1010) 购自北京索莱宝科技有限公司; 鳗鲡圆环病毒 DNA 由临床病料组织中提取, 本实验室自行保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 目的基因的获得与原核表达质粒的构建

根据 EeCV Cap 蛋白基因组序列 (GenBank 登录号: NC 023421.1) 设计特异性引物 EeCV-Cap-F1: 5'-ATGCCATTCTACCGGAGGCG-3' 和 EeCV-Cap-R1: 5'-CTATGCGCTGCGTAGATTCCA-3'。以临床组织病料中提取的 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增回收目的片段。目的片段送往上海生工生物有限公司进行测序, NCBI 比对正确后进行密码子优化。分别在优化后的序列 5' 和 3' 端加入 *Bam* H I 和 *Xho* I 两种酶切位点, 由上海生工生物工程有限公司合成 EeCV Cap 全序列。分别用限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Xho* I 将人工合成的 EeCV Cap 蛋白全长序列与载体 pET-32a (+) 进行酶切, 回收酶切产物后使用 T4 DNA 连接酶连接, 并转化入大肠埃希菌 DH5 α 。筛选阳性克隆扩大培养, 双酶切鉴定重组质粒 pET32a-EeCV-Cap。

1.3 目的蛋白的诱导表达

将重组质粒 pET32a-EeCV-Cap 转化至大肠埃希菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 挑取阳性克隆后, 在 LB 培养基 (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素和 34 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯霉素) 中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6, 加入终浓度为 0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IPTG, 分别于 20 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6 h, 阴性对照组未添加 IPTG。4 $^{\circ}\text{C}$ 、4000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 收集重组菌。每 100 mg 湿菌体加入 3 mL 菌体裂解液 (8 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 0.1% Triton X-100, pH 8.0) 进行重悬, 于冰水浴中超声破碎。收集上清与沉淀, 用于后续 SDS-PAGE 分析蛋白的表达情况。

1.4 目的蛋白的纯化

目的蛋白纯化参考赵强等^[14]的方法稍作改动。平衡 Ni-NTA 亲和层析柱后, 将超声裂解收集的上清液通过 Ni-NTA 亲和层析柱进行纯化, 流速为 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 再以洗涤液 (含 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑) 洗脱杂蛋白; 最后以洗脱液 (含 500 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑) 对目的蛋白进行洗脱, 透析脱盐后保存在蛋白缓冲液中。使用 PEG 20000 浓缩蛋白液, 0.45 μm 滤膜过滤分装保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.5 目的蛋白鉴定

处理后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后的蛋白胶于 23 V、30 min 转印至 NC 膜, 并于 5% 牛血清蛋白 4 ℃ 过夜封闭; 封闭结束后以 1:5000 的比例在磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline-Tween-20, PBST) 中加入小鼠抗 6 × His Tag 单克隆抗体, 室温摇床孵育 1 h 后用 PBST 洗膜 5 次。将 HBR 标记山羊抗小鼠 IgG 和 PBST 按 1:5000 稀释, 室温摇床孵育 1 h; 二抗孵育完毕用 PBST 洗膜 5 次, 避光显色 2 min 后观察结果。

1.6 蛋白质结构的检测及组装特性分析

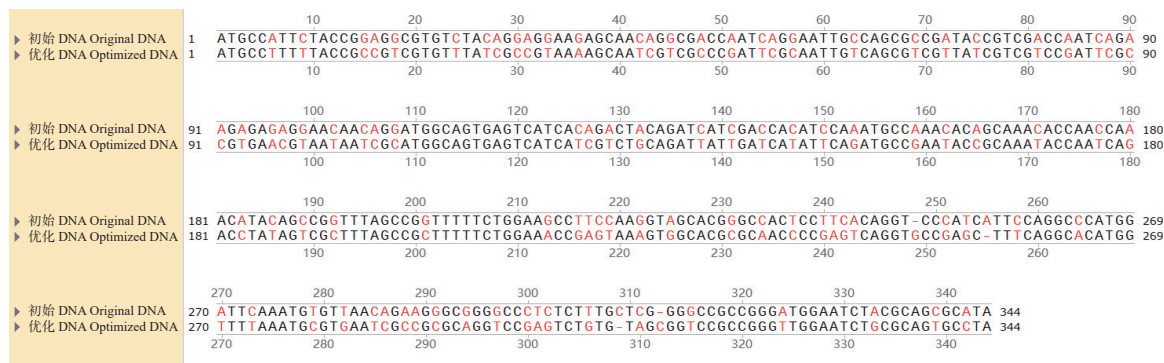
蛋白质样品的透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察方法如下: 用戊二醛

和 1% 锇酸固定样品, 酒精脱水后使用丙酮和环氧树脂渗透, 最后再用环氧树脂包埋。固化之后将样品修成合适的大小和形状, 置于切片机上切片, 厚度 60~100 nm, 铅和铀双染色后置于 TEM (型号: Tecnai G2 20 TWIN) 下观察分析 EeCV Cap 蛋白的组装特性。

2 结果与分析

2.1 原核表达质粒的鉴定

以临床病鳗中提取的 DNA 为模板, PCR 扩增 EeCV Cap 蛋白基因, 测序后进行密码子优化 (图 1), 并交由生工生物 (上海) 有限公司进行全序列合成, 不含终止密码子。



红色部分为优化位点。

Red portion indicates optimization site.

图 1 密码子优化位点

Fig. 1 Map of codon optimization sites

使用限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Xho* I 对 pET-32a-EeCV-Cap 重组质粒进行双酶切鉴定, 获得 357 bp 的 EeCV Cap 蛋白基因和 5900 bp 的载体片段 (图 2),

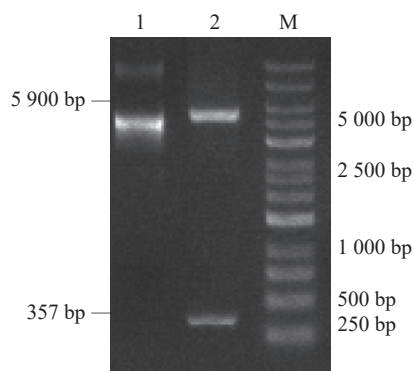
条带大小符合预期。质粒测序结果与密码子优化后的序列完全相符, 说明成功构建重组表达质粒 pET-32a-EeCV-Cap。

2.2 重组菌的诱导表达及可溶性分析

诱导后的重组菌 pET-32a-EeCV-Cap 在 31 kDa 左右有一条明显的条带, 与预期大小相符。收集 20 ℃ 诱导培养 16 h 和 37 ℃ 诱导培养 6 h 后的菌体沉淀, 重悬沉淀后超声裂解, 分别对上清和沉淀进行分析。结果表明 EeCV Cap 蛋白可在原核表达系统中表达, 且在 20 ℃ 使用 0.5 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导 16 h 时, 其表达量高于 20 ℃ 诱导培养 16 h 的表达量 (图 3)。

2.3 EeCV Cap 的纯化及 Western blot 分析

重组菌表达的可溶性蛋白经镍柱纯化后, 得到高纯度、单一的目的蛋白 (图 4a)。将纯化后的蛋白进行 Western blot 鉴定。一抗为小鼠抗 6×His Tag 单克隆抗体, 二抗为 HBR 标记山羊抗小鼠 IgG, 在 31 kDa 处有一条明显的特异性条带, 符合预期大小 (图 4b)。

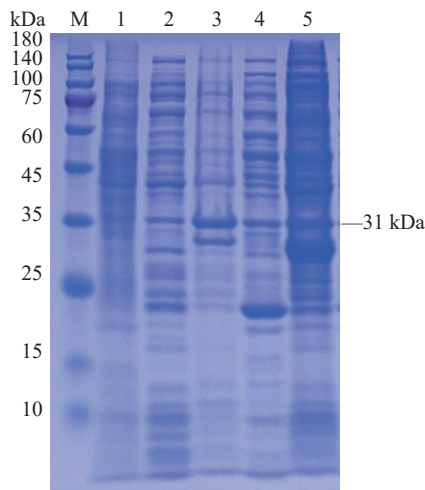


M: DNA marker; 1: pET-32a-EeCV-Cap 重组质粒; 2: pET-32a-EeCV-Cap 重组质粒 *Bam* H I/*Xho* I 酶切。

M: DNA marker; 1: pET-32a-EeCV-Cap recombinant plasmid; 2: pET-32a-EeCV-Cap recombinant plasmid *Bam* H I/*Xho* I digestion.

图 2 pET-32a-EeCV-Cap 重组质粒的双酶切鉴定

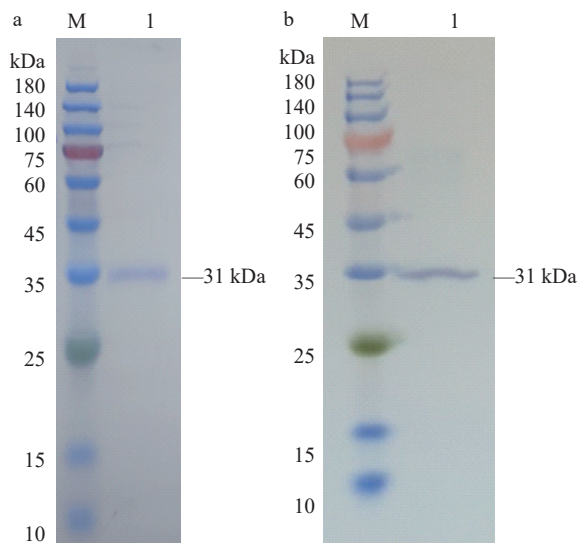
Fig. 2 Double enzyme digestion on pET-32a-EeCV-recombinant plasmid



M: 蛋白 marker; 1: 未诱导菌液; 2: 20 ℃ 诱导表达上清; 3: 20 ℃ 诱导表达沉淀; 4: 37 ℃ 诱导表达上清; 5: 37 ℃ 诱导表达沉淀。
M: protein marker; 1: bacterial solution not induced; 2: supernatant of solution with induced expression at 20 ℃; 3: precipitate of solution with induced expression at 20 ℃; 4: supernatant of solution with induced expression at 37 ℃; 5: precipitate of solution with induced expression at 37 ℃.

图 3 重组蛋白 SDS-PAGE 表达鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant protein by SDS-PAGE

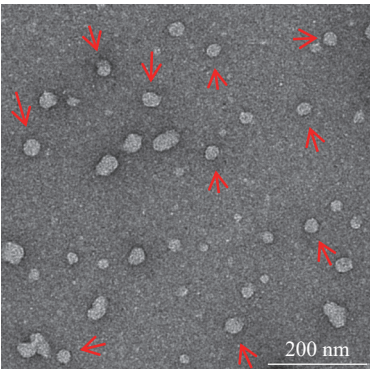


a: SDS-PAGE 电泳; b: Western blot 验证。M: 蛋白 marker; 1: 纯化后带 His 标签的 EeCV Cap 蛋白。
a: SDS-PAGE electrophoresis; b: Western blot; M: protein marker; 1: EeCV-Cap purified with a His tag.

图 4 纯化后带 His 标签的 EeCV Cap 蛋白
Fig. 4 Purified EeCV-Cap with a His tag

2.4 EeCV Cap 的透射电镜观察

经过固定包埋染色后的蛋白样品，在 TEM 下可观察到 20 nm 左右的病毒样颗粒，与天然圆环病毒粒子相似。说明利用原核系统表达的 EeCV Cap 能够自发组装成形态结构良好的 VLPs (图 5)。



红色箭头处为 VLPs。

VLPs are pointed at by red arrows.

图 5 VLPs 的透射电镜观察

Fig. 5 TEM images of VLPs

3 讨论

VLPs 是由病毒 Cap 蛋白自组装形成的类似病毒的空心颗粒^[15]。VLPs 模仿了天然病毒粒子的整体结构^[16]，保留了与天然病毒相似的抗原构象，所以与天然病毒难以区分，能激发机体强烈的细胞免疫与体液免疫，适合作为同源病毒的疫苗^[17]；VLPs 不含有病毒的基因组结构，不具有传染性和可复制性，具有安全性的优势^[7, 18]。目前，VLPs 在水产上也逐渐进入研究阶段，例如 Shivappa 等^[19]构建的传染性胰脏坏死病毒 VLPs，用其免疫后的大西洋鲑 (*Salmo salar*) 攻毒后死亡率下降至 56%；Marsian 等^[20]利用构建的神经坏死病毒 VLPs 免疫舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*)，死亡率显著低于对照组。表明制备 EeCV VLPs 作为疫苗使用具有较好的应用前景。

真核和原核表达系统均是表达病毒 Cap 蛋白基因的常用系统，其中大肠埃希菌表达系统具有遗传背景清楚、操作简便、成本低等优点，被广为应用^[21]。亲和层析法纯化的优点是高效、快速、纯化效果好、杂蛋白少，缺点是成本高^[22]。为了获得较高纯度的 EeCV Cap 蛋白，本试验采用大肠埃希菌表达系统制备 EeCV Cap 蛋白，并使用亲和层析法进行纯化。关于 EeCV Cap 蛋白克隆表达的研究尚未见报道，而圆环病毒属中猪圆环病毒研究较为广泛。张英婕等^[23]通过原核表达系统制备出猪圆环病毒 2 型 VLPs，25 ℃ 诱导表达 10 h，并通过镍柱纯化获得约 27 kDa 的 Cap 蛋白，直径大小约为 17~20 nm，与本试验制备的 EeCV VLPs 的大小相似。本研究通过比较 20 ℃ 诱导培养 16 h 和 37 ℃ 诱导培养 6 h 的表达量，发现 EeCV Cap 蛋白在 20 ℃ 诱导条件下表达量更好。

本研究通过 EeCV Cap 蛋白基因组的密码子优化

和人工合成,完成了重组质粒 pET32a-EeCV-Cap 的构建,并在原核表达系统中实现了 EeCV Cap 蛋白的可溶性表达。优化诱导条件后将目的蛋白成功纯化,经 SDS-PAGE 与 Western blot 鉴定,纯化后的 EeCV Cap 重组蛋白约为 31 kDa,与预期结果相同。EeCV Cap 蛋白经透射电镜观察,能在体外成功自发组装成直径 20 nm 左右的 VLPs。本研究为研制出成本低廉、安全有效、效果稳定的 EeCV 亚单位疫苗及相关生物制品奠定了基础。

参考文献:

- [1] 胡园,周朝生,胡利华,等.海、淡水养殖日本鳗鲡肌肉和鱼皮营养成分比较[J].水生生物学报,2015,39(4):730-739.
HU Y, ZHOU C S, HU L H, et al. Comparative analysis of the nutritional composition in the muscles and skins of *Anguilla japonica* cultured in the seawater and freshwater [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(4): 730-739. (in Chinese)
- [2] 胡成钰,洪一江,饶伟贤,等.欧洲鳗鲡 (*Anguilla anguilla*) 病害调查[J].南昌大学学报(理科版),2002,26(1):88-91.
HU C Y, HONG Y J, RAO W X, et al. The research for diseases in *Anguilla anguilla* [J]. *Journal of Nanchang University (Natural Science)*, 2002, 26(1): 88-91. (in Chinese)
- [3] 王巧煌.鳗鲡源气单胞菌毒力基因及其耐药性分析[J].大连海洋大学学报,2024,39(3):383-391.
WANG Q H. Virulence genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* spp. from eel *Anguilla* spp. [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2024, 39(3): 383-391. (in Chinese)
- [4] 林而舒.鳗鲡圆环病毒 SYBR Green I qPCR 检测方法的建立与应用[J].淡水渔业,2023,53(3):54-61.
LIN E S. Establishment and application of SYBR Green I real-time fluorescence quantitative PCR for detection of eel circovirus [J]. *Freshwater Fisheries*, 2023, 53(3): 54-61. (in Chinese)
- [5] 李苗苗.鳗鲡圆环病毒 PCR 检测方法的建立及应用[J].福建农业学报,2018,33(1):12-16.
LI M M. A PCR methodology for detecting eel circovirus [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 33(1): 12-16. (in Chinese)
- [6] 林而舒,卓玉琛,陈斌,等.鳗鲡疱疹病毒与鳗鲡圆环病毒双重 PCR 检测方法的建立[J].福建农业学报,2022,37(11):1394-1399.
LIN E S, ZHUO Y C, CHEN B, et al. Establishment and application of duplex PCR detection system between anguillid herpesvirus and eel circovirus [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37(11): 1394-1399. (in Chinese)
- [7] 杨媛茹,焦雪,宋维林,等.犬细小病毒 VP2 蛋白特点及病毒样颗粒疫苗制备研究进展[J].中国畜牧兽医,2023,50(8):3286-3293.
YANG Y R, JIAO X, SONG W L, et al. Research progress on the characterization of canine parvovirus VP2 protein and preparation of virus-like particles vaccine [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 50(8): 3286-3293. (in Chinese)
- [8] 赵梓名,李响,高洁.衣壳修饰对病毒样颗粒稳定性及其免疫原性的影响[J].病毒学报,2023,39(6):1778-1793.
ZHAO Z M, LI X, GAO J. Effect of capsid modification on the stability and immunogenicity of viruslike particles [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2023, 39(6): 1778-1793. (in Chinese)
- [9] 吕慧芳,王雅诗,张刘涛,等.家蚕中猪细小病毒病毒样颗粒的制备[J].中国兽医杂志,2024,60(7):20-25.
LYU H F, WANG Y S, ZHANG L T, et al. Preparation of porcine parvovirus virus-like particles in silkworms [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2024, 60(7): 20-25. (in Chinese)
- [10] 李玲,李国新,徐彦召,等.猪圆环病毒衣壳蛋白在昆虫细胞中表达形成病毒样颗粒的研究[J].中国动物传染病学报,2011,19(5):15-20.
LI L, LI G X, XU Y Z, et al. Expression of porcine circovirus capsid protein in insect cells and self-assembled into VLPs [J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2011, 19(5): 15-20. (in Chinese)
- [11] 柴书军,杨苏珍,刘运超,等.猪细小病毒 4 型单克隆抗体制备及抗原表位鉴定[J].畜牧与兽医,2024,56(8):77-84.
CHAI S J, YANG S Z, LIU Y C, et al. Preparation and epitope identification of monoclonal antibodies against porcine parvovirus type 4 [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2024, 56(8): 77-84. (in Chinese)
- [12] 邵婷,吴斯宇,高彩霞,等.基因 II 型草鱼呼肠孤病毒病毒样颗粒的构建与鉴定[J].水产学报,2023,47(7):150-159.
GAO T, WU S Y, GAO C X, et al. Construction and identification of genotype II grass carp reovirus virus-like particles [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2023, 47(7): 150-159. (in Chinese)
- [13] 朱志煌,林建伟.神经坏死病毒疫苗免疫后 3 种免疫相关基因在斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 组织中的表达研究[J].渔业研究,2019,41(6):470-477.
ZHU Z H, LIN J W. Expression patterns of three immune-related genes in tissues of *Epinephelus coioides* after injecting nerve necrosis virus vaccine [J]. *Journal of Fisheries Research*, 2019, 41(6): 470-477. (in Chinese)
- [14] 赵强,赵云环,郭禹,等.猪圆环病毒 2 型病毒样颗粒的制备及免疫原性评价[J].中国兽医学报,2022,42(8):1529-1534.
ZHAO Q, ZHAO Y H, GUO Y, et al. Preparation and immunogenicity evaluation of porcine circovirus type 2 virus-like particles [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2022, 42(8): 1529-1534. (in Chinese)
- [15] 高远,邵先凯,陈玉清,等.病毒样颗粒自组装与解组装的动力学研究[J].厦门大学学报(自然科学版),2023,62(5):833-841.
GAO Y, SHAO X K, CHEN Y Q, et al. Kinetic study on self-assembly and disassembly of virus-like particles [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2023, 62(5): 833-841. (in Chinese)
- [16] 吕兆伟,刘冰,李耀政,等.分子伴侣促进猪细小病毒 VLPs 可溶性表达及免疫原性研究[J].黑龙江畜牧兽医,2024(14):102-110.
LYU Z W, LIU B, LI Y Z, et al. Study on molecular chaperones promoted soluble expression and immunogenicity of porcine

- parvovirus VLPs particles [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2024(14): 102–110. (in Chinese)
- [17] 郭晓旭, 张帅, 刘莹, 等. 携带 BCoV 抗原表位的乙型肝炎病毒核心抗原病毒样颗粒的制备及免疫效果评价 [J]. *中国预防兽医学报*, 2023, 45 (2): 178–184.
- GUO X X, ZHANG S, LIU Y, et al. Preparation of hepatitis B virus core antigen VLPs carrying BCoV epitopes and immunization effect evaluation [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2023, 45(2): 178–184. (in Chinese)
- [18] 李岩昇, 吕娜, 贾思凝, 等. 体外组装的病毒样颗粒在疫苗和药物递送中的应用 [J]. *生物技术进展*, 2023, 13 (2): 201–209.
- LI Y Y, LYU N, JIA S N, et al. Application of virus like particles assembled *in vitro* in vaccine and drug delivery [J]. *Current Biotechnology*, 2023, 13(2): 201–209. (in Chinese)
- [19] SHIVAPPA R B, MCALLISTER P E, EDWARDS G H, et al. Development of a subunit vaccine for infectious pancreatic necrosis virus using a baculovirus insect/larvae system [J]. *Developments in Biologicals*, 2005, 121: 165–174.
- [20] MARSIAN J, HURDISS D L, RANSON N A, et al. Plant-made nervous necrosis virus-like particles protect fish against disease [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 880.
- [21] 刘项羽, 聂庆庆, 杜恩岐. C-端嵌合 PRRSV T 细胞抗原表位对 PCV2 VLPs 稳定性的影响 [J]. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 2022, 50 (11): 9–16.
- LIU X Y, NIE Q Q, DU E Q. Effect of C-terminal chimeric PRRSV T cell epitopes on stability of PCV2 VLPs [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2022, 50(11): 9–16. (in Chinese)
- [22] 何荣强. 一种抗体融合蛋白 Ni 柱亲和层析纯化效果的研究 [J]. *药物生物技术*, 2023, 30 (2): 118–123.
- HE R Q. Analysis of Ni affinity chromatography purification effect of antibody fusion protein [J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2023, 30(2): 118–123. (in Chinese)
- [23] 张英婕, 周文锋, 邹亚文, 等. 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. *中国兽医科学*, 2024, 54 (2): 217–225.
- ZHANG Y J, ZHOU W F, ZOU Y W, et al. Preparation and identification of monoclonal antibodies of porcine circovirus type 2 capsid protein [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2024, 54(2): 217–225. (in Chinese)

(责任编辑: 张梅)