

人偏肺病毒 F1、F2 亚单位原核表达系统的构建及多克隆抗体制备

郭丽茹, 李晓燕, 孔梅, 刘英华, 邹明, 苏旭

摘要: 目的 构建人偏肺病毒融合蛋白亚单位 F1、F2 原核表达系统, 初步获得抗 F1、F2 重组蛋白的多克隆抗体, 为相关疫苗的研究奠定基础。方法 聚合酶链反应 (PCR) 法扩增 F1、F2 基因片段, 经 T-A 克隆确保其准确性, 双酶切后插入原核表达载体 pET32a (+) 中, 转化大肠埃希菌 BL21 (DE3), 按优化后条件大量诱导表达, 纯化后经 Western Blot 检测特异性。取纯化蛋白免疫 BALB/c 小鼠制备多克隆抗体, ELISA 法检测效价, 间接免疫荧光法 (IFA) 检测多克隆抗体是否能与人偏肺病毒发生特异性反应。结果 F1、F2 基因均正确插入 pET32a (+) 中, 并具有正确的读码框架。0.5 mmol/L IPTG 37 °C 诱导培养 5 h 可获得大量带 His 标签的重组蛋白, 纯化后浓度分别达到 200 μg/ml 和 300 μg/ml。Western Blot 结果显示, 重组蛋白可被抗 His 标签抗体特异识别; 免疫小鼠获得多克隆抗体效价分别为抗 pET32a-F1 最高 1:640, 抗 pET32a-F2 最高 1:40 960。IFA 显示抗 pET32a-F1、抗 pET32a-F2 多克隆抗体均可与人偏肺病毒作用产生特异性荧光。结论 成功构建了 F1、F2 的原核表达质粒, 并在大肠埃希菌中获得高效表达, 该蛋白具有良好的抗原性; 免疫小鼠获得特异性多克隆抗体, 有利于人偏肺病毒的深入研究。

关键词: 人偏肺病毒; F1、F2 亚单位; 多克隆抗体

中图分类号: R373.1

文献标志码: A

文章编号: 1003-9961(2015)11-0964-05

Establishment of prokaryotic expression system and polyclonal antibodies preparation of F1, F2 subunit gene of human metapneumovirus GUO Li-ru, LI Xiao-yan, KONG Mei, LIU Ying-hua, ZOU Ming, SU Xu. Tianjin Municipal Center for Disease Control and Prevention, Tianjin 300011, China

Corresponding author: LI Xiao-yan, Email: glr82@163.com

Abstract: Objective To establish a prokaryotic expression system of F1, F2 subunit gene of human metapneumovirus, prepare the corresponding polyclonal antibodies and provide evidence for the development of vaccine.

Methods The F1, F2 gene was amplified with PCR, and cloned into vector of pET32a (+) after T-A cloning and double digests. The recombinant proteins were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) according to the optimized conditions, purified and tested by using Western Blot, and subsequently used to immunize BALB/c mouse. The resultant polyclonal antibodies were evaluated with ELISA assays. Immunofluorescence assays were used to test if the prepared antiserum could specifically reacted with the fusion protein. **Results** F1, F2 genes were correctly inserted pET32a (+), and had correct reading frames. A large number of recombinant proteins with His tag expressed after inducing by 0.5 mmol/L IPTG at 37 °C for 5 h, and the concentration of purified products reached 200 μg/ml and 300 μg/ml respectively. Western Blot results showed that the recombinant proteins could be identified by His tag antibody specifically; the highest valence of antibodies in immunized mouse were 1:640 (anti-F1 sera) and 1:40 960 (anti-F2 sera). The results of immunofluorescence assays showed that the prepared antiserum could specifically reacted with F protein. **Conclusion** The recombinant plasmids of pET32a-F1 and pET32a-F2 were successfully constructed and expressed efficiently in *E. coli*, the recombinants had good antigenicity and efficient polyclonal antibodies were attained by immunized BALB/c mouse. The results of the study can be used in the further research of MPV infection.

Key words: Human metapneumovirus; F1, F2 subunit; Polyclonal antibody

This study were supported by the fund from China Postdoctoral Science Foundation (No. 2013M541186), Tianjin Natural Science Foundation (No. 15JCYBJC24700) and Scientific Research Foundation of Tianjin Municipal Health Bureau (No. 2013KY20)

基金项目: 中国博士后科学基金 (No. 2013M541186); 天津市自然科学基金 (No. 15JCYBJC24700); 天津市卫生局科技基金 (No. 2013KY20)

作者单位: 天津市疾病预防控制中心病原生物检测所, 天津 300011

作者简介: 郭丽茹, 女, 天津市人, 硕士, 病原生物学专业, 主要从事呼吸道病毒检测工作

通信作者: 李晓燕, Tel: 022-24333490, Email: glr82@163.com

收稿日期: 2015-06-19

随着人类对疾病认识程度加深和检测手段的更新,越来越多新的病毒被认知。人偏肺病毒(Human metapneumovirus, hMPV)是 21 世纪新发现病毒之一,由荷兰学者 van den Hoogen 等^[1]于 2001 年从患呼吸道感染的婴幼儿标本中分离,并根据基因序列及结构将其划分为副粘病毒科、肺病毒亚科、偏肺病毒属。hMPV 流行范围遍布全球,受不同采集时间、判断标准的影响,各地检出率差异较大,尚未发现明确的地理分布相关性。hMPV 可感染各年龄组人群,儿童尤其易感,哥伦比亚一项近 10 年的研究显示,75% 的感染者为 <5 岁的患儿,5~10 岁儿童几乎 100% 具有既往感染史^[2-3]。hMPV 可引发各种呼吸道症状,从轻微的发热、咳嗽、气促到毛细支气管炎和肺炎^[4],严重程度与呼吸道合胞病毒类似而重于腺病毒、鼻病毒等其他呼吸道病毒^[5]。hMPV 感染近几年在国内多有报道,但由于此病毒分离困难,获得的毒株非常有限,疫苗研究进展缓慢。

融合蛋白(Fusion Protein, F)是 hMPV 表面的一种糖蛋白,介导病毒与细胞的融合,在病毒的感染和免疫中起着重要的作用,是目前研究可知刺激机体产生保护性抗体的重要抗原之一^[6],且在不同型别间同源性较高,所以成为表位疫苗研究的热点。本研究采用原核表达的方式,针对 F 蛋白具有生物学活性亚单位 F1、F2 分别制备重组蛋白,并以此免疫小鼠初步获得了抗 F1、抗 F2 多克隆抗体,为 F 蛋白免疫机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株及主要试剂 含有 hMPV 标准株 NL/1/99(GenBank: AY525843.1)全基因的克隆质粒由荷兰鹿特丹大学医学中心的 Eric Claassen 教授馈赠。pET32a(+)原核表达载体、表达菌株 BL21(DE3)、Vero-E6 细胞及 hMPV 毒株为笔者实验室保存。各种限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T-4 DNA 连接酶以及 pMD19-T 载体试剂盒均为 TaKaRa 公司产品。质粒抽提与切胶纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司。异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自 Sigma 公司,His 标签蛋白包涵体纯化试剂盒为康为世纪公司产品,抗 His 标签鼠单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 抗体、预染蛋白 Marker III(MP204)均为天根公司产品,QuickAntibody-Mouse2W 佐剂购自北京博奥龙免疫技术有限公司。抗 hMPV 单克隆抗体购自美国 Chemicon, FITC 标记的羊抗鼠 IgG 购自北京中杉金

桥生物公司。

1.2 引物设计及 PCR 扩增 以 GenBank 中 NL/1/99 F 蛋白基因序列为模板分 2 个片段设计引物,所用设计软件为 primer 5.0,两端分别加入 *Bam*H I 和 *Hind*III 酶切位点(引物中下划线部分),酶切位点前各加入 3 个保护性碱基。引物由上海英俊公司合成,序列分别为:NL/1/99-F1-F 5'-CCG GGA TCC TTT GTG AGC AAA AAC CTG-3',NL/1/99-F1-R 5'-CCG AAG CTT CTG ATC CTC AGG AAA CTT-3';NL/1/99-F2-F 5'-CCG GGA TCC AAG GAG AGT TAT TTG GAA G-3',NL/1/99-F2-R 5'-CCG AAG CTT TCT TGA TTG TCT GGG-3'。用以上引物以 NL/1/99 全基因组质粒为模板,分别扩增 F1 及 F2 基因片段,预期产物大小 F1 为 864 bp, F2 为 249 bp。

1.3 pET32a-F1 及 pET32a-F2 重组质粒的构建 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收,用 QIAquick Gel Extraction Kit Protocol 纯化后与 pMD19-T 载体连接,方法参照 pMD19-T Vector 试剂盒进行,克隆序列送上海英俊公司测序,结果与 GenBank 中 F1、F2 序列进行比对。

将测序正确的 T-A 克隆质粒进行 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切,与同样双酶切后的原核表达载体 pET32a(+)按 3:1 摩尔比的量用 T-4 DNA 连接酶于 16 °C 过夜连接。连接产物转化新鲜制备的 BL21(DE3)感受态细胞,同时转化未连接 F1 或 F2 的 pET32a(+)质粒作为对照,经 10% 氨苄西林(Amp)筛选,挑取阳性克隆提取质粒再行双酶切及测序鉴定。

1.4 重组质粒表达体系的优化及表达形式的分析 挑取鉴定正确的单克隆接种于 LB 液体培养基(含 10% Amp),37 °C 过夜培养,按 1:100 转入 20 ml LB 液体培养基,37 °C 200 r/min 培养至 A_{600} 在 0.6~0.8 时,取部分菌液为未加诱导剂的阴性对照,余下的菌液中加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,分 2 组采用不同温度进行诱导表达,一组诱导条件为 37 °C,另一组则置于 30 °C,200 r/min 振荡培养 5 h,每隔 1 h 收获部分菌液。将各时段菌液以 $5\ 000 \times g$ 4 °C 离心 15 min,收集菌体沉淀,冰浴超声破菌,输出能量为 20%,5 s/次,每次间隔 5 s,重复至菌液达到半透明状态。 $14\ 000 \times g$ 离心 15 min,分别收集上清和沉淀,SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.5 重组蛋白的纯化 取阳性克隆菌液以 1:100 的体积比扩大培养,采用优化后的条件进行大量表达,用康为世纪包涵体试剂盒处理菌体沉淀,收获

重组蛋白。采用 GE 公司 1 ml 镍亲和层析柱,参考康为世纪 His 标签蛋白包涵体纯化试剂盒的方法对目标蛋白进行纯化。

将目的蛋白洗脱峰部分的蛋白洗脱液合管,放入透析袋(截留分子量 15 kD),加入 0.01 mmol/L 的 PBS (pH 7.5),放入磁力搅拌器,4 °C 层析柜中透析 17 h,换液 2 次。收集蛋白溶液行 SDS-PAGE 并用 Bradford 法测定蛋白浓度。

1.6 Western Blot 法鉴定纯化蛋白特异性 取纯化后蛋白的 SDS-PAGE 凝胶,在 15 V 恒压下经 17 min 转移至硝酸纤维素膜,5% 脱脂奶封闭,4 °C 过夜。转天加入 1:500 稀释的鼠抗 His 标签单克隆抗体,室温孵育 2 h,清洗后加入 1:300 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 抗体,室温下孵育 2 h 后用康为世纪公司的增强型 HRP 底物显色剂进行 DAB 显色。

1.7 重组蛋白多克隆抗体制备及效价测定 取纯化后的重组蛋白经 Bradford 法测定各蛋白浓度,按 20 µg/ml 分装保存。取雌性 5 周龄 BALB/c 小鼠 6 只, F1 与 F2 组各 3 支,采用 新型佐剂 Quick Antibody-Mouse2W 按 1:1 体积比分别与 F1、F2 重组蛋白混匀,以 20 µg/支对小鼠进行后小腿肌肉注射免疫,14 d 后采微量尾血进行酶联免疫吸附试验(ELISA)测定。

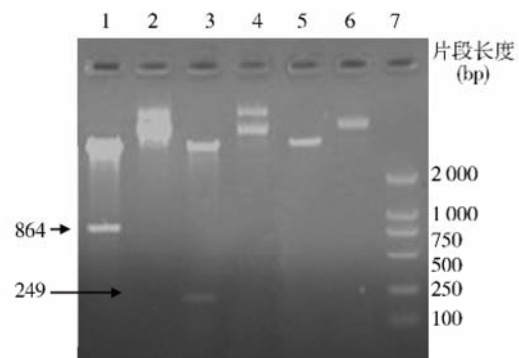
使用包被缓冲液将纯化的 F1、F2 重组蛋白分别稀释至 2 µg/ml,每孔加 100 µl 于 96 孔反应板,4 °C 过夜,次日洗涤液洗 5 次,加入含 10% 胎牛血清的 PBST 室温封闭 2 h,分别将 F1、F2 重组蛋白免疫小鼠获得的血清按 1:40, 1:160, 1:640, 1:2560, 1:10 240, 1:40 960 稀释,各取 100 µl/每孔加入到重组蛋白包被的孔中,每个稀释度平行做 3 孔,取 1:40 稀释的免疫前小鼠血清作为阴性对照,0.01 mol/l PBS 作空白对照,37 °C 孵育 1 h,洗板后加入 1:1000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,37 °C 孵育 30 min, HRP 底物显色液进行显色,5 min 后加终止液,酶标仪检测,以空白对照孔调零后测各孔 A_{450/630} 值,当结果大于阴性对照 A 值的 2.1 倍,即 P/N > 2.1 判为阳性。

1.8 间接免疫荧光法检测重组蛋白多克隆抗体特异性 按 1% 比例接种 hMPV 毒株到 Vero-E6 细胞,37 °C 5% CO₂ 条件下培养至出现细胞病变。收获 hMPV 感染的 Vero-E6 细胞制备抗原片,分别取最高效价的 F1、F2 重组蛋白免疫血清,1:40 稀释后滴加到抗原片孔中,分别以免疫前小鼠血清及抗 hMPV 抗体为阴性和阳性对照。37 °C 湿盒内反应 30 min,

PBS 洗 3 次,干燥后滴加 1:50 稀释的 FITC-羊抗鼠 IgG,37 °C 湿盒内再反应 30 min, PBS 清洗后加 10% 甘油封片镜检。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定 重组质粒经 *BamH* I 和 *Hind* III 酶切,除 pET 载体片段,pET32a-F1 可见约 864 bp 清晰条带,pET32a-F2 获得一条约 249 bp 的目的片段(图 1),片段大小与预期插入片段大小相符,表明 F1、F2 基因片段已成功插入 pET32a (+) 载体。测序结果表明,F1、F2 蛋白基因插入位置和读码框都正确无误。



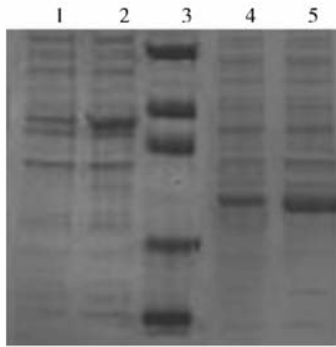
注: 1. pET32a-F1 酶切产物; 2. pET32a-F1 重组质粒; 3. pET32a-F2 酶切产物; 4. pET32a-F2 重组质粒; 5. pET32a (+) 酶切产物; 6. pET32a (+) 空质粒; 7. DNA Marker DL2000。

图 1 pET32a-F1、pET32a-F2 酶切电泳结果
Figure 1 Enzyme digestion electrophoretogram of pET32a-F1 and pET32a-F2

2.2 重组质粒表达条件的优化 SDS-PAGE 电泳结果表明,F1、F2 与 pET32a (+) 的重组质粒能够较好的表达,pET32a-F1 在 50 kD 附近、pET32a-F2 在 30 kD 附近出现一条新的蛋白条带,与 F1 (50.81 kD)、F2 (28.59 kD) 重组蛋白预测大小基本吻合。

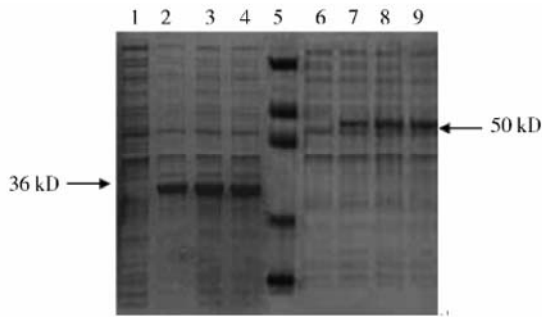
同时经 IPTG 诱导表达 5 h,pET32a-F1、pET32a-F2 均在 37 °C 表达产量更高(图 2)。在同为 37 °C 诱导条件下,一定时间范围内,pET32a-F1、pET32a-F2 表达产量随时间延长而增多,但诱导 5 h 后表达产量不再明显增多(图 3),故本实验大量表达时取诱导 5 h 的蛋白进行后续试验。

2.3 重组质粒表达形式分析 重组质粒经超声破菌及 SDS-PAGE 鉴定后发现,F1、F2 重组蛋白大部分以包涵体的形式存在,经包涵体试剂盒处理后,大部分杂蛋白以可溶的形式存在于裂解液上清中,菌体沉淀中的主要成分为目的重组蛋白,见图 4。



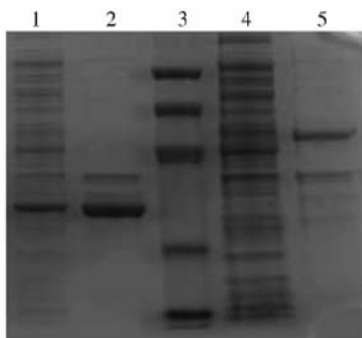
注:1. pET32a-F1 经 30 °C 诱导表达产物; 2. pET32a-F1 经 37 °C 诱导表达产物; 3. 蛋白分子质量标准, 从上向下依次为 94 kD, 60 kD, 45 kD, 27 kD, 18 kD; 4. pET32a-F2 经 30 °C 诱导表达产物; 5. pET32a-F2 经 37 °C 诱导表达产物。

图 2 重组质粒经不同温度诱导表达产物电泳结果
Figure 2 Electrophoretogram of expressed recombinants induced at different temperatures



注:1. pET32a-F2 未诱导; 2-4. pET32a-F2 分别诱导 3、4、5 h 表达产物; 5. 蛋白分子质量标准, 从上向下依次为 94 kD, 60 kD, 45 kD, 27 kD, 18 kD; 6. pET32a-F1 未诱导; 7-9. pET32a-F1 分别诱导 3、4、5 h 表达产物。

图 3 重组质粒经不同时间诱导表达产物电泳结果
Figure 3 Electrophoretogram of expressed recombinants induced for different times

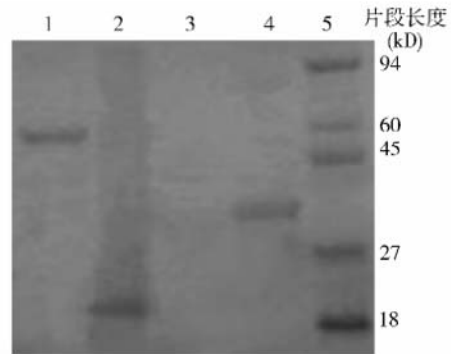


注:1. pET32a-F2 经 IPTG 诱导表达的上清; 2. pET32a-F2 经 IPTG 诱导表达的沉淀; 3. 蛋白分子质量标准, 从上向下依次为 94 kD, 60 kD, 45 kD, 27 kD, 18 kD; 4. pET32a-F1 经 IPTG 诱导表达的上清; 5. pET32a-F1 经 IPTG 诱导表达的沉淀。

图 4 重组蛋白表达产物可溶性鉴定
Figure 4 Detections of dissolubility of expressed recombinants

2.4 重组蛋白特异性鉴定 由于目前尚没有商品化的 F 蛋白单克隆抗体, 故用鼠抗 His 标签的单克

隆抗体对本研究中连接了 His 标签的重组蛋白进行 Western Blot 检测, 结果显示带 His 标签的重组 F1、F2 蛋白分别在 50 kD 和 30 kD 左右出现染色条带, 与 SDS-PAGE 条带大小吻合, 说明重组蛋白可被抗 His 标签的单克隆抗体特异性识别, 见图 5。



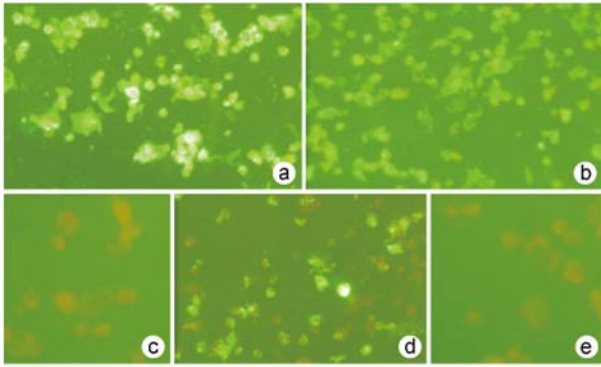
注:1. pET32a-F1 IPTG 诱导表达产物; 2. pET32a 空质粒 IPTG 诱导表达产物; 3. pET32a 空质粒未诱导; 4. pET32a 未诱导; 5. 预染蛋白 Marker。

图 5 重组蛋白 Western Blot 结果
Figure 5 Detections of expressed recombinants with Western Blot

2.5 重组蛋白多克隆抗体的制备及 IFA 检测结果经 Bradford 法测定, pET32a-F1 重组蛋白的纯化产物浓度为 200 μg/ml, pET32a-F2 重组蛋白纯化后蛋白浓度为 300 μg/ml。用纯化的重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠初步制备了鼠抗 F1 重组蛋白和鼠抗 F2 重组蛋白血清, 经间接 ELISA 方法检测, 3 只小鼠抗 pET32a-F1 血清效价分别为 1: 640、1: 320、1: 640, 抗 pET32a-F2 血清效价分别为 1: 40 960、1: 10 240、1: 10 240。分别取效价最高的免疫小鼠血清与 hMPV 病毒感染的 Vero-E6 细胞进行间接免疫荧光检测, 结果显示, 以 F1 重组蛋白和 F2 重组蛋白免疫血清作为一抗的抗原片上均可见特异性荧光颗粒, 而未经重组蛋白免疫的小鼠血清(免前血清)则 IFA 呈现阴性反应, 见图 6。

3 讨论

大量研究提示, hMPV 已成为除流感和呼吸道合胞病毒外导致儿童急性呼吸道感染的重要病原, 其致病和免疫机制的研究不可懈怠^[7-8]。hMPV 是单负链非节段性 RNA 病毒, 基因组共编码 9 个蛋白, 依次为 3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5', 其中 F 蛋白是公认的可以保护机体免受病毒攻击的有效抗原之一, 且相比别的蛋白遗传性更稳定, 在不同基因型 hMPV 中变异极小, 同源性高达 95%, 很有可能成为不同型别间交叉免疫的关键因素^[9]。



注:a. pET32a-F1 免疫小鼠血清; b. pET32a-F2 免疫小鼠血清; c. 抗 hMPV 抗体; d. pET32a-F1 免前小鼠血清; e. pET32a-F2 免前小鼠血清。

图 6 多克隆抗体的间接免疫荧光反应 (400 ×)
Figure 6 IFA for specific identification of polyclonal antibodies of mice (400 ×)

F 蛋白结构特殊,其前体蛋白并无生物学活性,需经宿主细胞蛋白酶作用裂解成亚单位 F1 和 F2 后才发挥其融合作用^[10]。为了更好地模拟 F 蛋白在体内作用方式,笔者将其从裂解位点 (RQSR) 处分成两个片段^[11],去除氨基酸信号肽序列和位于羧基端的锚定区,分 F2 (58 - 306) 和 F1 (502 - 1365) 两个亚单位来构建重组质粒。另外,hMPV F 蛋白 B 细胞表位预测显示,15 - 28、88 - 102、163 - 188、195 - 202、206 - 213、245 - 257、290 - 299、302 - 309、318 - 334、410 - 419、515 - 526 区段显示多种预测方法基本一致,有较好的亲水性、可及性和较高的抗原性指数,并且在二级结构上含有易形成抗原表位的转角和不规则卷曲结构,因此这些区域最有可能成为 B 细胞表位^[12]。去除两端疏水区域后,笔者选取的 F2 和 F1 片段基本囊括了以上绝大多数的预判 B 细胞表位,重组蛋白免疫动物所制备的多克隆抗体可以满足以上大多表位的研究需求,并尽可能多地保留了 F 蛋白上具备潜在抗原表位条件的区域,为后续 F 蛋白抗原位点的研究提供有力支持。

本研究结果表明,F2 和 F1 亚单位均可在 pET-32a(+) 原核表达系统中得到高效表达。由于目前很少有商品化的针对 F 蛋白的高效价免疫血清,构建、表达 F1 与 F2 的重组质粒,正是为了试图用纯化后的重组蛋白免疫小鼠获得可与 F 蛋白特异反应的抗血清。原核表达系统虽然缺乏蛋白翻译后的加工修饰功能,难以体现空间构象,但操作简单、周期短、产量高,并且可满足引发免疫反应的需求。本研究显示,经 pET-32a(+) 原核系统表达的重组蛋白免疫小鼠后,可获得效价较高的多克隆抗体,并可与感染了 hMPV 的 Vero-E6 细胞可发生特异的

免疫荧光反应,说明它可特异识别 hMPV,具有良好的抗原性和特异性。

本研究同时将 hMPV 融合蛋白的 F1 和 F2 亚单位进行了重组表达,避开 F 蛋白全长不好表达的困扰,同时尽可能多地覆盖了潜在的抗原位点,得到了纯度较高的 pET32a-F1、pET32a-F2 融合表达蛋白,并免疫小鼠收获了高效价的鼠抗 F1 和鼠抗 F2 多克隆抗体,为 F 蛋白免疫保护机制的研究及表位疫苗的研发奠定基础。

参考文献

- [1] van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, et al. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus [J]. *Virology*, 2002, 295 (1) : 119 - 132.
- [2] AL Turab M, Chehadeh W, AL Nakib W. Phylogenetic analysis of human metapneumovirus detected in hospitalized patients in Kuwait during the years 2009 - 2011 [J]. *J Infect Public Health*, 2015, 8 (5) : 448 - 457.
- [3] Barbosa RJ, Pulido DP, Rey BG, et al. Human respiratory syncytial virus and metapneumovirus in patients with acute respiratory infection in Colombia, 2000 - 2011 [J]. *Rev Panam Salud Publica*, 2014, 36 (2) : 101 - 109.
- [4] Fairchok MP, Martin ET, Chambers S, et al. Epidemiology of viral respiratory tract infections in a prospective cohort of infants and toddlers attending daycare [J]. *J Clin Virol*, 2010, 49 (1) : 16 - 20.
- [5] Wang Y, Ji W, Chen Z, et al. Comparison of severe pneumonia caused by Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in hospitalized children [J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2014, 57 (3) : 413 - 417.
- [6] Chang A, Masante C, Buchholz UJ, et al. Human metapneumovirus (HMPV) binding and infection are mediated by interactions between the HMPV fusion protein and heparan sulfate [J]. *J Virol*, 2012, 86 (6) : 3230 - 3243.
- [7] Wang Y, Ji W, Hao CH, et al. Comparison of bronchiolitis of human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus [J]. *Acta Virol*, 2015, 59 (1) : 98 - 100.
- [8] Sun QF, Yan YD, Chen ZR, et al. Etiology of different lower respiratory tract infections in hospitalized children [J]. *Chinese Journal of Practical Pediatrics*, 2014, 29 (3) : 214 - 217. (in Chinese)
- [9] 孙秋凤, 严永东, 陈正荣, 等. 下呼吸道感染性疾病 7794 例病原分布研究 [J]. *中国实用儿科杂志*, 2014, 29 (3) : 214 - 217.
- [10] Yang CF, Wang CK, Tollefson SJ, et al. Genetic diversity and evolution of human metapneumovirus fusion protein over twenty years [J]. *Viol J*, 2009, 6 : 138.
- [11] Wei YW, Zhang Y, Cai H, et al. Roles of the putative integrin-binding motif of the human metapneumovirus fusion (F) protein in cell-cell fusion, viral infectivity, and pathogenesis [J]. *J Virol*, 2014, 88 (8) : 4338 - 4352.
- [12] Zhu RN, Qian Y, Deng J, et al. Sequence analysis of the F genes from human metapneumovirus recently isolated from children in Beijing [J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2005, 25 (10) : 837 - 841. (in Chinese)
- [13] 朱汝南, 钱渊, 邓洁, 等. 北京地区人偏肺病毒融合蛋白 F 编码基因的序列分析 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2005, 25 (10) : 837 - 841.
- [14] Mao HW, Zhao XD. Prediction of the B cell epitopes of human metapneumovirus fusion protein [J]. *Immunological Journal*, 2006, 22 (3) : 289 - 293. (in Chinese)
- [15] 毛华伟, 赵晓东. 人类偏肺病毒 F 蛋白的 B 细胞表位预测 [J]. *免疫学杂志*, 2006, 22 (3) : 289 - 293.