

doi:10.3969/j.issn.1000-484X.2018.09.015

• 免疫学技术与方法 •

呼吸道合胞病毒 L 蛋白单克隆抗体的制备<sup>①</sup>

向江艳 詹炉停 赵敏 张伟 郑子峥 夏宁邵 (厦门大学分子疫苗学与分子诊断学国家重点实验室,厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心,厦门 361102)

中图分类号 R373.1 文献标志码 A 文章编号 1000-484X(2018)09-1354-06

[摘要] 目的:制备人呼吸道合胞病毒 L 蛋白单克隆抗体,并对其进行性质鉴定。方法:选取 RSV-A2 L 蛋白上具有亲水性可能的 loop 区段,将这些目的片段展示在 HBc149 上进行原核表达并纯化。重组蛋白免疫 6~8 周 BALB/c 雌性小鼠,根据免疫后血清的 ELISA 和 WB 分析结果选择 L3935 和 L4099 组小鼠进行脾脏免疫。融合后,用间接 ELISA 法筛选和多次克隆化,获得稳定分泌抗 L 蛋白单克隆抗体细胞株,并结合 ELISA、免疫荧光和免疫印迹对所获得的单抗进行鉴定。结果:获得 11 株 L 蛋白特异性单克隆抗体,亚类鉴定结果 IgG1、IgG2a 和 IgG3 单抗各 3 株,IgG2b 单抗 2 株。结论:成功制备了 L 蛋白特异性单克隆抗体,也为 RSV 感染的免疫和发病机制研究奠定基础。

[关键词] 呼吸道合胞病毒;L 蛋白;单克隆抗体;肽段展示

Preparation of monoclonal antibodies against respiratory syncytial virus L protein

XIANG Jiang-Yan ZHAN Lu-Ting ZHAO Min ZHANG Wei ZHENG Zi-Zheng XIA Ning-Shao. National Institute of Diagnostics and Vaccine Development of Infectious Diseases, State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics, Xiamen University, Xiamen 361102, China

[Abstract] Objective: To prepare the monoclonal antibodies specifically against L protein of human respiratory syncytial virus, and to characterize these antibodies. Methods: The potential hydrophilic loop regions of RSV-A2 L protein were displayed on the vector HBc149 by using prokaryotic expression and purification. Recombinant protein was used to immunize female BALB/c mice for 6 to 8 weeks old, according to the results of ELISA and WB analysis, and the mice of group L3935 and L4099 were immunized by the spleen. And then the hybridoma cells stably secreting McAb against L protein were selected by indirect ELISA detection. The monoclonal antibodies was identified by ELISA, immunofluorescence assay and immunoblotting analysis. Results: Eleven Lprotein specific monoclonal antibodies were obtained. Three mAbs were identified as IgG1 subtype, three as IgG2a, three as IgG3 and two as IgG2b. Conclusion: Lprotein specific monoclonal antibodies are successfully prepared, which will lay the foundation for the study of immunity and pathogenesis of RSV infection.

[Key words] Respiratory syncytial virus; L protein; Monoclonal antibody; Peptide display

呼吸道合胞病毒(human respiratory syncytial virus, hRSV 或 RSV)是一种单股负链 RNA 病毒,属于副黏液病毒科肺炎病毒属<sup>[1,2]</sup>,是引起全球范围内婴幼儿下呼吸道感染的主要病原之一,两周岁以内的婴幼儿几乎都感染过 RSV<sup>[3]</sup>。RSV 感染后,机会会激发中和抗体及 T 细胞免疫反应,两者均在病毒

清除后逐渐衰退,从而导致一生中反复感染 RSV<sup>[4]</sup>。

RSV 基因组共有 10 个基因,编码 11 个蛋白<sup>[5]</sup>,其中 L 蛋白(Large nucleoprotein)为 RSV 的 RNA 聚合酶,包含 2 165 个氨基酸,分子量为 250 kD<sup>[6]</sup>,是 RSV 病毒颗粒中最大的蛋白,也是核衣壳的重要组成部分,P 与 N<sup>[7,8]</sup>、L 以及 M2-1 蛋白<sup>[9]</sup>相结合形成核衣壳;另外,N 与 P 蛋白共定位包涵体,为病毒核酸合成提供场所<sup>[10]</sup>。目前对 RSV L 蛋白的结构、结构与功能的关系研究还不够深入,病毒感染复制过程中 RNA 合成机制以及核相关蛋白在不同阶段的表达情况及相互作用尚无明确阐述。本研究通过对 L

①本文为国家自然科学基金(No. 81401668)项目。  
作者简介:向江艳,女,在读硕士,主要从事呼吸道合胞病毒动物模型及流行病学方面的研究,E-mail:1767537307@qq.com。  
通讯作者及指导教师:郑子峥,男,博士,副教授,主要从事戊型肝炎病毒及呼吸道合胞病毒感染机制方面研究,E-mail:zhengzizheng@xmu.edu.cn。

蛋白进行肽段展示来制备线性表位抗体,为今后病毒感染机制及疫苗研究提供检测试剂。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验材料、试剂和仪器** 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株、293FT 和骨髓瘤细胞 Sp2/0-Ag14 (Sp2/0)、载体 pC149-mut (简称 HBC) 与 F1 代腹水小鼠 (本实验室提供);6~8 周雌性 BALB/c 小鼠 (SPF 级) (上海斯莱克公司);ER2566 菌株 (NEB 公司);Full-L、GFP 质粒及 Hep2 细胞、RSV A2 病毒 (美国 NIH 疫苗研究中心馈赠);限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶 (华美生物工程公司);Taq-DNA 聚合酶、逆转录酶 AMV 和 RNasin (Promega 公司);Trizol (Roche 公司);RNaseA、DNase I、氨基蝶呤、PEG1500、DAPI、FITC 荧光标签抗体及弗氏佐剂 (美国 Sigma 公司);胎牛血清和小牛血清 (Hyclone 公司);细胞培养所用 RPMI1640、DMEM、MEM 培养基、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸及脂质体 Lipofectamine2000 (Invitrogen 公司);抗生素 (华北制药);硝酸纤维素膜 (PVDF) (Millipore 公司);质粒小量提取试剂盒和 PCR 产物胶回收试剂盒 (QIAGEN 公司);ELISA 相关试剂 (北京万泰公司);GAM-HRP (晶美公司);化学发光底物 (Thermo 公司);IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-l-thiogalactopyranoside, 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷) (AMRESCO 公司)。

CO<sub>2</sub> 培养箱 (美国 Forma 公司);全湿转印仪、Power Pac 300 多用电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司);Nikon Eclipse80 正置显微镜、Nikon coolpix990 数码相机 (日本 Nikon 公司);酶标仪 (奥地利 TECAN 公司)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 肽段设计** 从 GeneBank 中下载 RSV-A2 L 蛋白 (KT992094.1) 的基因序列,全长 2 165 个氨基酸。利用 DNAsar 软件对 L 蛋白进行亲疏水性分析,避开  $\alpha$  螺旋区域并选取亲水区与表面区域肽段 (部分截图如图 1A),采用 15 肽展示 相邻肽段之间 5 肽重叠的方式 (如图 1B) 构建了共 161 条短肽肽库。使用 Blast 分析并确定所有肽段具有呼吸道合胞病毒特异性。

**1.2.2 基因克隆** 肽展示片段的扩增与制备:短肽对应的 DNA 正负链 (带 EcoR I 和 BamH I 酶切位点) 稀释至 10  $\mu$ mol/L,各取 10  $\mu$ l 与 30  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 混匀。按 90 $^{\circ}$ C 10 min,70 $^{\circ}$ C 10 min,70 $^{\circ}$ C 水中退火至室温 (25 $^{\circ}$ C) 步骤,制备目的片段。通过 BamH I 与 EcoR I 双位点酶切、T4 连接酶将目的片段重组

到 HBC149 载体上 (如图 1C)。

常规分子生物学操作,如:普通 PCR 扩增、质粒酶切鉴定、片段与载体酶切、目的片段与载体连接等参考《分子克隆实验指南》第三版<sup>[11]</sup>;质粒小量提取、小量 DNA 片段胶回收参考 QIAGEN 公司相应试剂盒说明书。

**1.2.3 蛋白表达纯化与复性** 从平板上挑选单个 DH5 $\alpha$  菌落转移至 2 ml 的 LB (加相应抗生素) 液态培养基 37 $^{\circ}$ C 振荡过夜,再取 200  $\mu$ l 加至 2 ml 的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 振荡 2 h,OD600 nm 约为 0.6;加入 IPTG 至 0.5 mmol/L,设置温度梯度诱导 4、6 或 8 h 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 4 min 收集菌体,裂解液重悬,冰浴超声破碎菌体;4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 10 min 后取上清逐滴加入等体积 20% 或 40% 饱和硫酸溶液,混匀后静置 20 min,3 000 r/min 离心 10 min,生理盐水溶解沉淀。

将上述溶液置 PB5.8 缓冲体系 (16 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,184 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,300 mmol/L NaCl 和 50 mmol/L EDTA 用盐酸或氢氧化钠溶液调节 pH 为 5.8 即可) 中透析,然后在 50~65 $^{\circ}$ C 水浴 30 min 期间不断振荡,至出现蛋白沉淀,4 $^{\circ}$ C、2 000 r/min 离心 20 min 去除沉淀,上清转移到透析袋中并置 PB5.8 缓冲体系 (体积为上清-蛋白样品的 20 倍以上) 中透析,每隔 3~4 h 换新配的透析液,共 3 次;再将透析液换为 PBS 透析全程用磁力搅拌器搅拌,环境温度为 4 $^{\circ}$ C。最后收集透析袋内的样品经 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min,上清即为目的蛋白的复性液。

**1.2.4 小鼠免疫与脾脏免疫** 免疫方案:选取 6~8 周龄 BALB/c 雌鼠,2 只/组 经背部皮下、四肢肌

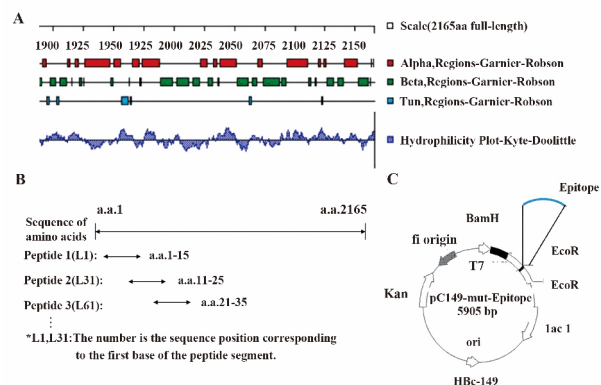


图 1 肽段展示、质粒构建与表达

Fig. 1 Peptide display, construction and expression of plasmid

Note: A. Secondary structure analysis of L protein; B. Scheme of peptide display; C. Construction of plasmid

肉、腹股沟皮下等注射免疫原(纯化复性蛋白)。注射前,样品(100 μg/只)与佐剂等体积混合,用注射器反复吹吸成乳液,4℃放置 30 min,用酒精棉球消毒小鼠后进行免疫。初免时,使用完全弗氏佐剂(Complete Freund's adjuvant, CFA);初免 2 周后开始第一次加免,使用不完全弗氏佐剂(Incomplete Freund's adjuvant, ICFA),此后每周加免一针,共加免 4 次。在第三、四和五周免疫前对小鼠进行眼球采血,血样 37℃ 孵育 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清-20℃ 保存待检。上述免疫结束后 4~6 周进行脾脏免疫:乙醚麻醉小鼠,剖开腹腔外皮取出脾脏,沿脾脏纵向注射 100 μg 抗原,再用手术针线缝合切口。

**1.2.5 细胞融合** 在融合之前准备饲养层细胞,将一只年龄为 13 d 左右的 BALB/c 小鼠脱颈处死,75%乙醇浸泡 5 min 消毒。转移至超净工作台,使其腹部朝上,剪开外皮暴露胸腔,取出胸腺,经 200 目细胞筛研磨后得到胸腺饲养细胞悬液。脾免 72 h 后,无菌取脾脏制成单细胞悬液与 SP2/0 细胞融合,采用常规 PEG 促融合方法。ELISA 检测融合细胞分泌上清筛选克隆阳性细胞株;有限稀释法克隆细胞株,将阳性孔的细胞转移到 24 孔板中,再克隆化到 96 孔板进行培养,挑选单集落细胞孔重复克隆化直到连续出现 3 次以上的单克隆。

**1.2.6 间接法酶联免疫吸附分析(ELISA)** 蛋白(重组质粒或载体 HBc149 表达纯化蛋白)用 CB(0.05 mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液)稀释至 0.5 μg/ml,100 μl/孔加至聚苯乙烯板中,4℃过夜;弃掉液体,PBST(PBS+0.05% Tween-20)洗一次,2%牛血清白蛋白(PBS 配制)封闭,37℃ 1 h;弃去液体,将适当稀释比例的小鼠血清或单克隆抗体加入,37℃ 孵育 1 h;PBST 洗 5 次,加入 GAM-HRP 酶标抗体,37℃ 孵育 1 h, PBST 洗 5 次;显色液 A、B 等量混合,37℃ 反应 10~15 min,加终止液(2 mol/L 硫酸),用酶标仪单双波长 450 nm/630 nm 测定 OD 值。

**1.2.7 蛋白印迹分析(Western blot, WB)** 样品或抗原进行常规 SDS-PAGE 电泳<sup>[11]</sup>,恒流 300 mA, 90 min 将蛋白转移到硝酸纤维素膜,去离子水漂洗后,用 5% 脱脂奶[5 g 脱脂奶粉用 TN buffer 溶解并定容至 100 ml, TN buffer(pH8.0)成份:50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl]封闭 1 h;去离子水漂洗,用 TN 稀释待检样品,孵育 1 h;TNT(TN 中加 0.05% Tween-20)洗膜 3 次,每次 5 min;用 TN 稀释的 GAM-HRP 孵育 1 h,洗膜后;去离子水漂洗,化学

发光底物流遍膜表面,在 ImageQuant LAS 4000 化学发光成像仪上进行成像。

**1.2.8 单克隆抗体 IgG 亚类鉴定** 按照 Thermo scientific 公司单克隆抗体分型试剂盒说明书操作。

**1.2.9 免疫荧光** 圆形玻璃片(无菌干净)铺入 24 孔板,每孔加入  $1 \times 10^5$  个 Hep2 细胞。待细胞贴壁后,RSV A2 病毒株以 MOI=3 感染细胞,36 h 后去上清,PBS 洗涤;200 μl/孔预冷的 4%多聚甲醛,避光 10 min;洗涤后,200 μl/孔 0.3% Triton X-100,孵育 15 min。洗涤后 10%山羊血清封闭;一抗稀释合适梯度孵育 1 h,洗涤后避光孵育 FITC 标记的 GAM 二抗(PBS 稀释)1 h, PBS 洗涤;DAPI(PBS 稀释)避光孵育 5 min, PBS 洗涤;在载玻片上滴加封片剂(70%甘油,2.5%防淬灭剂),玻片有细胞面朝下盖上去,吸取多余液体,用指甲油封闭玻片四周,避光晾干。显微镜下观察,并采集图像。

**1.3 统计学处理** 核酸序列分析与比较采用 Blast 软件和 DNASTAR 软件;数据做图采用 GraphPad Prism 7.0;图片处理采用 ImageJ 及 Adobe Photoshop CS6 软件。

## 2 结果

### 2.1 免疫原制备

**2.1.1 基因克隆** 本研究中,我们选择 L 蛋白非疏水区肽段进行肽段展示,目的片段合成后重组到 HBc149 载体上,随后进行质粒转化及质粒小提。为了减少工作量,我们对菌液 PCR 体系及程序进行调试,使得目的条带在 500 bp 处,并得到了 117 个阳性克隆。经测序及序列比对,共有 102 个正确的重组质粒可用于下一步实验。

**2.1.2 重组蛋白表达与纯化** 将经过鉴定的 102 个质粒转化进 ER2566 菌株感受态中,加入 IPTG 使目的蛋白在上清中大量表达,发现 IPTG 在诱导温度为 30℃ 时诱导效果最好。20%和 40%饱和硫酸纯化蛋白,显示 40%硫酸较好纯化目的蛋白(如图 2A)。前期实验中发现,硫酸溶液的温度会影响纯化效率。因此,我们对加热温度进行调试,分别设置 45℃、50℃、55℃和 60℃,最后采用 55℃ 为热处理温度(如图 2B)。

### 2.2 单克隆抗体的制备

**2.2.1 小鼠免疫及免后血清分析** 重组质粒表达纯化后,获得 28 种目的蛋白可用于免疫小鼠,免疫方案见图 3A。以 Full-L 质粒转染 293FT 细胞裂解液为样品进行 WB 分析,第五周血清结果(如图 3B),显示只有 L2269、L3935 和 L4099 这 3 组免疫

蛋白的血清有较强阳性条带(如图 3B) 暗示这些肽段可能是 L 蛋白的线性表位,能有效刺激机体产生大量 L 蛋白特异性抗体。ELISA 检测免疫后小鼠血清中针对免疫原的抗体水平,第五周血清的反应性检测结果以 EC50(血清的稀释倍数)表示(如图 3C),发现 28 种免疫蛋白均能刺激小鼠产生较好的免疫应答。为确认血清反应性,挑选了 WB 阳性较强的 L3935 和 L4099 两组血清重复 WB 检测,以

病毒感染的 Hep2 细胞裂解液为对照(如图 4),发现这两种免疫原激发的血清抗体既能与质粒转染表达的 L 蛋白反应,也能与天然表达的 L 蛋白相互作用。

**2.2.2 L 蛋白抗体筛选** 根据免疫血清检测结果,选择血清反应性与 WB 阳性较强的 L3935 和 L4099 两组小鼠进行脾脏免疫、融合与单克隆细胞筛选,情况见表 1 所示,将得到的单克隆细胞分别进行细胞冻存和腹水纯化抗体。

**2.2.3 单克隆抗体鉴定** 将 11 株单克隆抗体进行 IgG 亚类分型、ELISA 检测 EC50(如表 2)和单抗性质鉴定与分析(如图 5)。亚类分型结果为:3 株 IgG1、3 株 IgG2a、2 株 IgG2b、3 株 IgG3,分布均匀,没有表现亚类偏向性;14A10 和 9H3 的 EC50 数值较小,分别为 0.032  $\mu\text{g}/\text{ml}$  和 0.093  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,说明这两株抗体对相应的免疫原的亲合力较强。WB 检测结果显示:L3935 有 2 株(13G4 和 14A10),L4099 有 3 株(2F7、9H3 和 13G2) WB 显示阳性(如图 5A);SDS-PAGE 分析(如图 5B)可见单克隆抗体的轻、重链均单一。

随后,挑选 14A10、9H3 两株单抗进行免疫荧光实验,对 RSV A2 感染的 Hep2 细胞内 L 蛋白进行定位(如图 6)。蓝色为 DAPI 对细胞核的染色,绿色为 GAM-FITC 指示 L 蛋白;结果显示 L 蛋白定位于宿主细胞的细胞膜表面、包涵体以及核区。

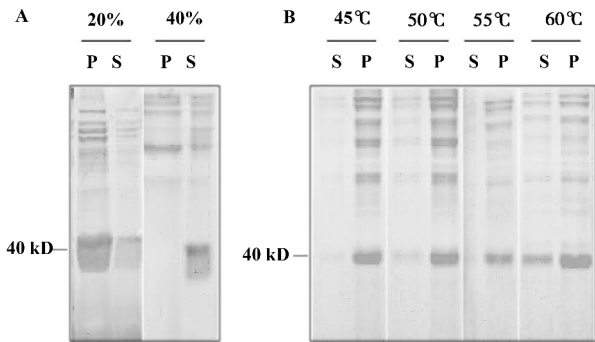


图 2 不同浓度硫酸(A)和热处理温度(B)的对比  
Fig.2 Comparison of different concentrations of Ammonium sulphate (A) and temperature of heat treatment(B)

Note: P. Precipitate; S. Supernatant.

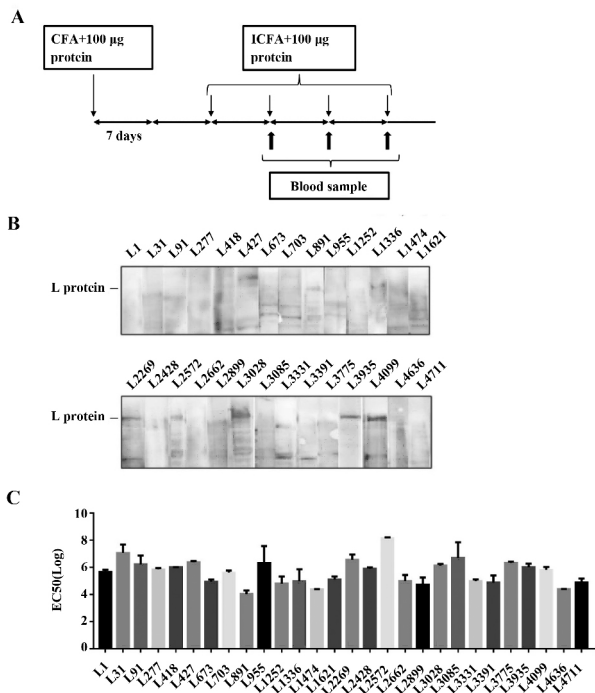


图 3 小鼠免疫及免疫血清检测  
Fig.3 Mouse immunization and serum detection

Note: A. Immunization scheme; B. Western blot; C. Reactivity.

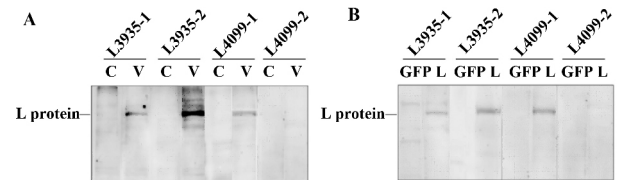


图 4 部分血清 Western blot 分析  
Fig.4 Western blot of partial serum

Note: A. Lysate of cells virus infected; B. Lysate of cells transfected with L plasmid; C. Lysate of Hep2 cells; L. Lysate of 293FT cells transfected with L plasmid; V. Lysate of Hep2 cells RSV A2 infected; GFP. Lysate of 293FT cells transfected with GFP plasmid.

表 1 融合与筛选情况

Tab.1 Summary of fusion and screening conditions

	ELISA value		Positive wells	
	HBc-L-peptide	HBc	L3935	L4099
After fusion	$\geq 1.0$	$< 0.5$	37	100
1st cloning	$\geq 1.0$	$< 0.5$	9	13
2nd cloning	$\geq 1.0$	$< 0.5$	3	8
3rd cloning	$\geq 1.0$	$< 0.5$	3	8
McAbs			3	8

表 2 11 株单抗分型及反应性

Tab.2 Subtypes and reactivity of 11 McAbs

McAbs	13E2	13G4	14A10	2F7	5D8	9H3	10C8	10D6	10F10	12H9	13G2
Subtype	IgG2a	IgG3	IgG1	IgG3	IgG2b	IgG2a	IgG1	IgG3	IgG2b	IgG2a	IgG1
EC50(μg/ml)	0.141	0.141	0.032	2.032	0.612	0.093	45.42	1.311	8.964	5.729	0.173

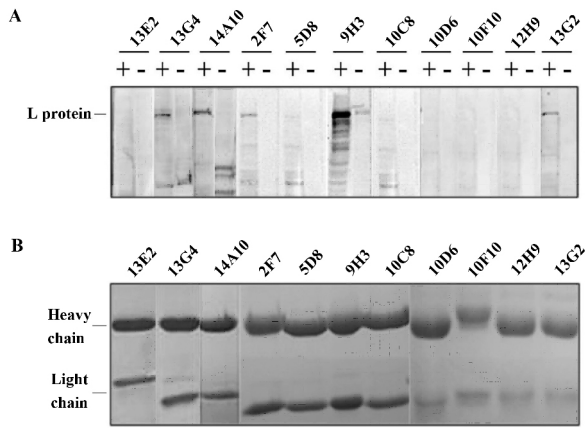


图 5 11 株单抗 WB(A) 和 SDS-PAGE(B) 分析  
Fig.5 Western blot (A) and SDS-PAGE (B) analysis of 11 McAbs

Note : +. Lysate of Hep2 cells RSV A2 infected; -. Lysate of Hep2 cells.

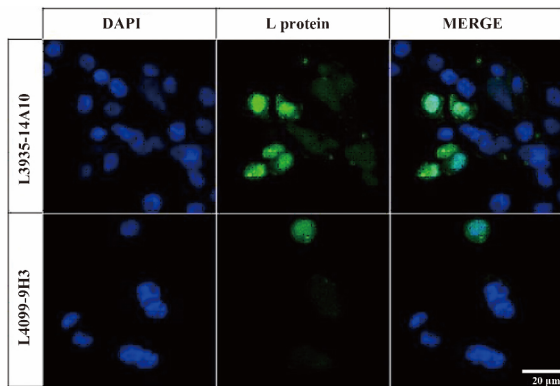


图 6 RSV 感染的 Hep2 细胞内 L 蛋白定位  
Fig.6 Localization of L protein in Hep2 cells RSV infected

### 3 讨论

一份全球疾病死亡率分析报告显示,一周岁以下儿童死亡约有 6.7% 是由 RSV 感染引起的<sup>[12]</sup>,是仅次于肺炎链球菌及副流感嗜血杆菌引起儿童下呼吸道感染死亡的第三大病原体;老年人感染 RSV 后会出现严重的症状甚至死亡<sup>[13,14]</sup>,目前针对 RSV 感染尚无有效治疗及预防措施。而对 RSV 感染的发病机制及机体抵抗 RSV 的免疫机制进一步理解

有助于为 RSV 疫苗的研究提供新的线索、为主动免疫预防 RSV 的疫苗研发开拓新的思路,从而有望减轻因 RSV 造成的全世界范围内医疗负担。L 蛋白的研究在 RSV 感染机制研究中占有重要地位,不可或缺。能用于免疫印迹及免疫荧光实验的单克隆抗体 14A10 和 9H3 的制备,对 RSV L 蛋白的结构以及结构与功能的关系研究、RSV 的生物学作用以及病毒感染机制研究提供基本实验检测材料。

本研究中免疫原制备前期,我们直接选择表面亲水非二级结构区域进行肽段展示的策略大大减少了不必要的工作量。考虑到基因工程抗原免疫原性较弱,我们采用初免混合完全弗氏佐剂,2 周后加强免疫混合不完全弗氏佐剂,每周一次共 4 针加免的免疫方案;ELISA 和 WB 检测结合的方式挑选能激发高亲和力血清抗体的免疫原;阳性细胞株筛选过程中,利用“双抗原筛选”的间接 ELISA 方法,不仅排除了血清抗体中针对载体 HBc149 的那部分抗体、避免假阳性的干扰,也大大提高了筛选抗体的准确性。最终获得 11 株抗 L 蛋白单克隆抗体,5 株显示 WB 阳性条带,其中 14A10 和 9H3 有较好的 WB 反应性;并免疫荧光实验对病毒感染后细胞内 L 蛋白进行定位;免疫荧光实验中 L 蛋白定位细胞膜表面可能指示正在出胞的 RSV 病毒颗粒;有报道显示 RSV L、P 及 N 蛋白和病毒 RNA 共定位于宿主细胞包涵体内,进行病毒核酸复制与转录<sup>[7,8,10]</sup>。另有报道显示 L 蛋白定位于被 RSV 感染的 Hep-2 细胞核周包涵体,暗示 N、P 和 L 可能与核膜有紧密联系<sup>[15]</sup>;图拉病毒(Tula virus)聚合酶 L 蛋白是一种负链 RNA 病毒来源的被描述为核周膜相关的蛋白<sup>[16]</sup>;而 L 蛋白在被感染细胞中的核特异性,提示 L 蛋白可能拥有其他未知功能,为 RSV 感染机制研究提供了新的信息。

### 参考文献:

[1] Pringle CR. The order Mononegavirales—current status [J]. Arch Virol, 1997, 142(11): 2321-2326.  
[2] Collins PL, Wertz GW. cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983, 80(11): 3208-3212.

- [3] Glezen WP, Taber LH, Frank AL, *et al.* Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus [J]. *Am J Dis Child*, 1986, 140(6):543-546.
- [4] Varga SM, Braciale TJ. The adaptive immune response to respiratory syncytial virus [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013, 372:155-171.
- [5] 曹健力, 张伟, 夏宁邵, 等. 呼吸道合胞病毒融合蛋白(F蛋白)结构及中和表位的研究进展 [J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(10):1568-1573.  
Cao JL, Zhang W, Xia NS, *et al.* The research development of Respiratory Syncytial Virus fusion protein structure and neutralizing epitopes [J]. *Chin J Immunol*, 2017, 33(10):1568-1573.
- [6] Tiong-Yip CL, Aschenbrenner L, Johnson KD, *et al.* Characterization of a Respiratory Syncytial Virus L Protein Inhibitor [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 58(7):3867-3873.
- [7] Garcia-Barreno B, Delgado T, Melero JA. Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions [J]. *J Virol*, 1996, 70(2):801-808.
- [8] Khattar SK, Yunus AS, Collins PL, *et al.* Deletion and substitution analysis defines regions and residues within the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus that affect transcription, RNA replication and interaction with the nucleoprotein [J]. *Virology*, 2001, 285(2):253-269.
- [9] Asenjo A, Calvo E, Villanueva N. Phosphorylation of human respiratory syncytial virus P protein at threonine 108 controls its interaction with the M2-1 protein in the viral RNA polymerase complex [J]. *J Gen Virol*, 2006, 87(Pt 12):3637-3642.
- [10] Castagne N, Barbier A, Bernard J, *et al.* Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(Pt 6):1643-1653.
- [11] Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. 3rd. USA: Cold Spring Harbor Lab (CSHL) Press, 2001: 1-2100.
- [12] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2012, 380(9859):2095-2128.
- [13] Walsh EE, Falsey AR. Respiratory syncytial virus infection in adult populations [J]. *Infect Disord Drug Targets*, 2012, 12(2):98-102.
- [14] Walsh EE, Peterson DR, Falsey AR. Is clinical recognition of respiratory syncytial virus infection in hospitalized elderly and high-risk adults possible? [J]. *J Infect Dis*, 2007, 195(7):1046-1051.
- [15] Carroumeu C, Simabuco FM, Tamura RE, *et al.* Intracellular localization of human respiratory syncytial virus L protein [J]. *Arch Virol*, 2007, 152(12):2259-2263.
- [16] Kukkonen SK, Vaheri A, Plyusnin A. L protein, the RNA-dependent RNA polymerase of hantaviruses [J]. *Arch Virol*, 2005, 150(3):533-556.

[收稿 2017-10-31 修回 2018-01-10]

(编辑 倪鹏)

## (上接第 1353 页)

- [12] Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development [J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(1):7.
- [13] Liz J, Esteller M. lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 2016, 1859(1):169-176.
- [14] Bae HJ, Noh JH, Kim JK, *et al.* MicroRNA-29c functions as a tumor suppressor by direct targeting oncogenic SIRT1 in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncogene*, 2014, 33(20):2557-2567.
- [15] Zhou X, Xia Y, Su J, *et al.* Down-regulation of miR-141 induced by helicobacter pylori promotes the invasion of gastric cancer by targeting STAT4 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(4):1003-1012.
- [16] Zhou X, Ye F, Yin C, *et al.* The interaction between MiR-141 and lncRNA-H19 in regulating cell proliferation and migration in gastric cancer [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(4):1440-1452.
- [17] Tejero R, Navarro A, Campayo M, *et al.* miR-141 and miR-200c as markers of overall survival in early stage non-small cell lung cancer adenocarcinoma [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7):e101899.
- [18] Zhang EB, Han L, Yin DD, *et al.* c-Myc-induced long noncoding H19 affects cell proliferation and predicts a poor prognosis in patients with gastric cancer [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(5):914.
- [19] Li H, Yu B, Li J, *et al.* Overexpression of lncRNA H19 enhances carcinogenesis and metastasis of gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(8):2318.
- [20] Conigliaro A, Costa V, Dico AL, *et al.* CD90<sup>+</sup> liver cancer cells modulate endothelial cell phenotype through the release of exosomes containing H19 lncRNA [J]. *Mol Cancer*, 2015, 14(1):155.
- [21] Gao Y, Meng H, Liu S, *et al.* lncRNA-HOST2 regulates cell biological behaviors in epithelial ovarian cancer through a mechanism involving microRNA let-7b [J]. *Human Mol Genet*, 2014, 24(3):841-852.
- [22] Liang WC, Fu WM, Wong CW, *et al.* The lncRNA H19 promotes epithelial to mesenchymal transition by functioning as miRNA sponges in colorectal cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(26):22513.
- [23] Zhang K, Luo Z, Zhang Y, *et al.* Circulating lncRNA H19 in plasma as a novel biomarker for breast cancer [J]. *Cancer Biomarkers*, 2016, 17(2):187-194.
- [24] Zhu M, Chen Q, Liu X, *et al.* lncRNA H19/miR-675 axis represses prostate cancer metastasis by targeting TGFBI [J]. *FEBS J*, 2014, 281(16):3766-3775.

[收稿 2018-01-05]

(编辑 刘格格)