

人类博卡病毒 HBoV1 基因组克隆及启动子活性分析

李京京^{1,2}, 孙彬¹, 欧阳锦凤¹, 陈莹¹, 韩虎¹, 刘凯于¹, 李毅¹

1 华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079

2 湖北师范学院生命科学学院, 黄石 435002

摘要: 人类博卡病毒 (Human bocavirus, HBoV) 是继细小病毒 B19 之后, 第 2 个被发现可引起人类疾病的细小病毒。通过 PCR 扩增方法从患有下呼吸道感染的患儿痰液中鉴定 HBoV, 以鉴定的阳性样本为模板, 利用分子生物学方法构建病毒基因组克隆并进行序列分析。2007 年 10 月-2009 年 3 月从湖北省妇幼保健院共收集 941 例下呼吸道感染患儿的痰液标本, 检测到 33 份 HBoV 阳性样品, 阳性率为 3.51% (33/941); 其中 1 岁以下婴幼儿患者占阳性样 72.7%; 构建了含有 HBoV 中间大片段基因克隆 WHL-1, 基因序列比对为 HBoV1 型, 序列全长 5 299 bp (GenBank Accession No. GU139423); PCR 扩增博卡病毒左端唯一启动子区, 分别构建病毒启动子增强型绿色荧光蛋白 (EGFP)/荧光素酶报告基因重组载体 pGL3-pBoV-EGFP/pGL3-Basic-pBoV, 转染哺乳动物细胞, 通过检测绿色荧光蛋白表达和荧光素酶活性定性并定量研究人类博卡病毒启动子在哺乳动物细胞中的活性; 结果显示, 启动子在试验细胞中都具有活性, 且比强启动子巨细胞病毒启动子 (Cytomegalovirus, CMV) 活性更高, 在 293T 细胞中 HBoV1 启动子活性是 CMV 的 4~5 倍; 已构建的基因组克隆和病毒启动子在哺乳动物细胞中表现的高活性为下一步的病毒转录、翻译分子机制的研究提供了平台。

关键词: 人类博卡病毒 (HBoV1), 克隆, 序列分析, 启动子活性

Genome cloning of human bocavirus (HBoV1) and analysis of viral promoter activity

Jingjing Li^{1,2}, Bin Sun¹, Jinfeng Ouyang¹, Ying Chen¹, Hu Han¹, Kaiyu Liu¹, and Yi Li¹

1 College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

2 College of Life Science, Hubei Normal University, Huangshi 435002, China

Abstract: Human bocavirus (HBoV) is a recently discovered parvovirus, which is suspected to be an etiologic agent of respiratory disease and gastrointestinal disease in human. In the present study, we screened 941 nasopharyngeal aspirates collected from hospitalized children with lower respiratory tract infections from October 9, 2007 to March 20, 2009 in the Children's Hospital of Hubei Province. Our results showed that 33 of 941 samples (3.51%) were detected positive for HBoV. To

Received: September 27, 2010; **Accepted:** December 7, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30670081).

Corresponding author: Yi Li. Tel/Fax: +86-27-67867226; E-mail: liyi@mail.cenu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 30670081) 资助。

obtain a full-length HBoV clone, three segments which covered the nearly full-length genome were amplified by PCR from HBoV positive samples separately and cloned into pBluescript SK II vector, and the resulting plasmid was designated as pWHL-1 (GenBank Accession No. GU139423). We constructed the both EGFP and luciferase reporter gene vectors under the control of the HBoV unique promoter, respectively. Our data demonstrated that the HBoV promoter exhibited very high activity in all mammalian cells tested by fluorescent microscopy observation of the EGFP and luciferase activity assay and its strength was 4–5 fold higher compared to that of the CMV promoter. This work provided an excellent tool for further study of the mechanism of transcription and expression of the viral genome.

Keywords: human bocavirus (HBoV1), cloning, sequence analysis, promoter activity

呼吸道病毒是引发婴幼儿呼吸道疾病的主要病原体, 目前仍有许多新病毒被不断发现。2005年, Allander 等^[1] 采用随机 PCR 扩增及生物信息学分析, 从下呼吸道感染患儿标本中检测到一种新的病毒, 命名为人博卡病毒 (Human bocavirus, HBoV)。随后, 许多国家相继报道发现 HBoV 感染, 且在患有肠胃炎的小儿粪便中也鉴定出人博卡病毒^[2]。HBoV 主要感染 2 岁以下婴幼儿, 临床症状主要表现为咳嗽、发热常伴有重症哮喘^[3], 伴随其他呼吸道病毒共感染^[4-5]。基因组序列分析表明, 该病毒与牛细小病毒 (BPV) 及犬微小病毒 (MVC) 在系统发育上接近, 将其归属于细小病毒亚科博卡病毒属。最近, 在胃肠道疾病患者的粪便中又发现了 3 种不同基因型的人博卡病毒 HBoV2、HBoV3 和 HBoV4^[6-8], 证明博卡病毒不仅是小儿呼吸道感染的病原体, 还会引发包括成人的病毒性肠胃炎疾病。

HBoV 为单链、线状 DNA 病毒, 全长约 5 200 nt, 由位于基因组左端的唯一启动子启动基因转录^[9], 该特征与红细胞病毒属、貂阿留申病毒属的许多病毒相同, 如人细小病毒 B19 基因组由唯一启动子 P6 调控 12 种转录子合成^[10-12]。2 个主要开放阅读框 (ORF) 分别编码非结构蛋白 NS1 和衣壳蛋白 VP1/VP2, 一个次要 ORF 编码 NP1, 其功能未知。由于博卡病毒属其他 2 个成员基因组两端都具有 ITR 序列, 该结构对病毒 DNA 复制起着重要作用^[13], 推测博卡病毒也具有 ITR 序列, 但目前还未得到相关序列。Dijkman 等首次报道, 在 HBoV1 感染的假分层人气管上皮细胞中检测到 6 个转录产

物, 且通过 real-time PCR 检测到病毒复制^[9]。随后, Chen 等报道了更完整的 HBoV1 转录图谱, 转录子 (Transcripts) 均由位于基因组左端的 P3 启动子启动转录, 转录图谱特征与博卡病毒属其他 2 位成员类似^[14]。细小病毒的敏感宿主细胞范围相对狭窄, 如 B19 只能在极少的几个细胞系中复制, 且效力很低。目前还未有人博卡病毒感染性克隆及其敏感细胞系的报道, 成为对该病毒感染机制研究的瓶颈。本实验从呼吸道疾病患儿痰液中鉴定出人博卡病毒, 并构建了病毒基因组克隆 (缺少 ITR), 基因序列分析表明为 HBoV1 型。构建了病毒启动子活性检测重组载体, 转染多种哺乳动物细胞, 实验证明 HBoV1 启动子在所试哺乳动物细胞中具有很高活性, 为进一步研究 HBoV1 的转录、翻译等分子机制提供重要平台。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及细胞

大肠杆菌菌株 DH10B、质粒 pBluescript SK II、pGL3-Basic、pEGFP-N1 由本实验室保存; 人胚肾上皮细胞 293T/293GP2P6、人肺成纤维细胞 WI-38AV、人肺癌细胞 A-549、兔肾细胞 RK13、猪鼻甲骨黏膜成纤维细胞 PT、HeLa 细胞由本实验室保存。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 (*EcoR* I、*Sal* I、*Xba* I、*Hind* III、*Bgl* II、*Nco* I)、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 聚合酶、DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司; DNA 片段胶回收试剂盒购自博大泰克公司; DNA marker、

高纯度质粒小提中量试剂盒购自天根 (Tiangen) 生物技术公司; TA Cloning 试剂盒、转染试剂 Lipofectamine Reagent 购自 Invitrogen 公司; 荧光素酶检测试剂盒 Luciferase Assay System 购自 Promega 公司; QIAmp DNA Mini Kit 购自 Qiagen 公司。DMEM 购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自 Hyclone 公司。

1.3 样品处理及病毒 DNA 提取

本实验 941 例痰液样品均采自湖北省妇幼保健院具有呼吸道感染症状的患儿。在痰样中加入 5 倍体积的生理盐水, 去除唾液, 然后加入等体积化痰剂 (含 0.1% DTT) 混匀, 37 °C 水浴 30 min 后 1 500 r/min 离心 10 min, 取上清。取 200 μ L 提取病毒 DNA, 剩余上清-70 °C 保存。QIAmp DNA Mini Kit 提取病毒基因组 DNA, 操作按照说明书进行。

1.4 PCR 检测

根据 GenBank 上已公布的人博卡病毒基因组序列 DQ000496^[1]设计引物 (Forward: 5'-TATCGTCTTGCACTGCTTCG-3'; Reverse: 5'-AGAGTAGGC GTGATCATGTAA-3'), 以提取的痰样病毒 DNA 为模板, 扩增保守区 NP1 基因, 引物合成由北京奥科生物公司完成。反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 HBoV1 基因组克隆的构建

取一管已鉴定为 HBoV 阳性的痰样 DNA 为模板, 根据 DQ000496 基因组测序结果, 结合 pBluescript SK II 载体的酶切位点, 对基因组分 3 段扩增: a 段 (1 408 bp)、b 段 (2 893bp) 和 c 段 (997 bp), 引物见表 1。利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 3 段 PCR 产物。先将 a 和 c 段与 T 载体连接, 转化 DH10B 感受态细胞, 挑取克隆并鉴定, b 段 PCR 扩增产物通过 *Hind* III 和 *Eco* R I 酶切位点插入 pBluescript SK II 载体, 再将 a 和 c 段分别通过 *Sal* I /*Hind* III、*Eco* R I /*Xba* I 酶切位点插入上述质粒中, 构建 HBoV1 基因组克隆, 酶切鉴定重组质粒。

表 1 构建 HBoV1 基因组克隆所用引物

Table 1 Primers used for construction of a full-length genome clone of HBoV1

Primer name	Primer sequence (5'-3')
a1(Forward)	ACGCGTTCGACGCCGGCAGACATATTGGA
a2(Reverse)	CCCAAGCTTTATGTCTGAGTCAAGCGA
b1(Forward)	CCCAAGCTTTACAGCTTTTGTG
b2(Reverse)	CGGAATTCTGCCTGTGCTGGCTG
c1(Forward)	CGGAATTCAGCCATACTCAAAACCA
c2(Reverse)	GCTCTAGATGTACAACAACAACACA

1.6 HBoV1 基因组测序及序列分析

将已连 T 载体的 a、c 段及插入 pBluescript SK II 载体的 b 段分别测序, 测序工作由北京奥科生物公司完成, 采用 Phrap 拼接基因组测序片段。采用 Sequin 完成序列注释和测序提交文件的生成, 测序后拼装的基因组命名为 WHL-1。利用 DNASTar 软件对已测 HBoV1 基因组序列和推导的氨基酸序列进行分析。

1.7 HBoV1 启动子重组载体的构建

根据 GU139423 序列设计启动子上下游引物, 分别引入 *Bgl* II、*Hind* III 酶切位点: 上游引物: 5'-GAAGATCTGCCGGCAGACATATTC-3', 下游引物: 5'-CCCAAGCTTAGTAGACTCACCACAAGCG T-3'。以 WHL-1 质粒为模板进行 PCR 扩增, 反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 PCR 产物。重组载体 pGL3-Basic-pBoV 的构建: 分别用限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Hind* III 对回收片段和 pGL3-Basic 载体质粒进行双酶切, 酶切回收产物 16 °C 连接过夜, 转化大肠杆菌 DH10B 感受态细胞, 挑取阳性克隆摇菌, 酶切鉴定后测序。重组载体 pGL3-pBoV-EGFP 的构建: 以 pEGFP-N1 质粒为模板扩增 EGFP 基因片段, 通过酶切连接将 EGFP 基因替换 pGL3-Basic-pBoV 载体上的荧光素酶基因 (*luc*+), 酶切鉴定后测序。阳性对照重组载体 pGL3-Basic-pCMV 的构建: 以

pEGFP-N1 质粒为模板扩增 CMV 启动子区, 插入 pGL3-Basic 载体上的 *Bgl* II 和 *Hind* III 酶切位点之间, 酶切鉴定后测序。

1.8 HBoV1 启动子活性检测

1.8.1 荧光显微镜检测 GFP 的表达

将试验细胞 (293T/293GP2P6、WI-38AV、A-549、RK13、PT、HeLa) 接种在 24 孔板中, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中过夜培养。在细胞长至 80% 时, 用 PBS 洗 2 遍细胞, 加入无血清培养基, 同时按 1:2 ($\mu\text{g}:\mu\text{L}$) 的比例将质粒 pGL3-pBoV-EGFP 与转染试剂 Lipofectamine 混合 (每孔加入 1 μg 质粒和 2 μL 转染试剂)。室温放置 30 min 后将混合物加入清洗过的细胞中, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h, 用含 10% 小牛血清的 DMEM 更换培养基继续培养, 以 pEGFP-N1 质粒转染各种细胞为阳性对照。24 h 后荧光显微镜观察。

1.8.2 荧光素酶报告基因活性测定

将试验细胞 (293T、WI-38AV、A-549、HeLa) 按 1×10^4 个细胞/孔的量接种在 96 孔板中, 质粒 pGL3-Basic-pBoV 转染细胞按照上述操作方式进行。以 pGL3-Basic-pCMV 质粒转染各种细胞为阳性对照。培养 24 h 后吸弃细胞培养基, 用 PBS 洗 1 次, 加入裂解液 20 μL /孔, 室温摇动 15 min。按照荧光素酶检测试剂盒 (Luciferase Assay System) 的操作说明书, 每孔加入 100 μL LAR 反应液, 混匀后加入 96 孔检测板, 设定微孔板式发光仪 (Centro LB 960) 延迟 2 s, 发光仪测读 10 s, 测读萤火虫荧光素酶发光值。转染试验重复 3 次, 数据采用 Origin6.0 软件进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 HBoV1 阳性样本的 PCR 检测

PCR 扩增产物表现为单一特异条带, 分子量约为 600 bp, 与预期结果相符 (图 1)。PCR 产物回收后连 T 载体测序, 利用 NCBI 网站的 Blast 工具对测序结果进行比对分析表明为 HBoV NP1 基因, 该基

因在博卡病毒属中非常保守, 成为博卡病毒鉴定常用目标基因。941 例痰液样本检测到 33 例 HBoV 阳性扩增产物, 阳性率为 3.51% (33/941)。33 例阳性患者临床诊断为肺炎或支气管肺炎, 且大多为 1 岁以下患儿 (24 例), 占整个患者阳性样的 72.7%; 为人类博卡病毒的易感人群。



图 1 HBoV1 NP 基因的 PCR 产物鉴定

Fig. 1 PCR products of HBoV1. 1: DNA marker I; 2,3,5: positive samples; 4: negative sample.

2.2 HBoV1 基因组克隆的构建

以 HBoV 阳性样本 DNA 为模板, 利用 PCR 方法分 3 段扩增病毒基因组, 通过琼脂糖凝胶电泳得到与预期扩增片段大小一致的 3 条产物: a 段 (1 408 bp)、b 段 (2 893 bp) 和 c 段 (997 bp) (图 2A)。按照方法 1.5 构建病毒基因组克隆, 双酶切鉴定如图 2B 所示: *Sal* I + *Xba* I 酶切下基因全长 (a+b+c); *Sal* I + *Hind* III 酶切下 a 段; *Hind* III + *Eco* R I 酶切下 b 段; *Eco* R I + *Xba* I 酶切下 c 段。初步验证成功构建了人博卡病毒基因组, 命名为 WHL-1。

2.3 HBoV1 基因组测序及序列分析

对已鉴定的含有病毒基因组各个片段的质粒进行测序, 测序结果拼接后最终获得 HBoV 基因组中间大片段序列, 该序列全长 5 299 bp, 编码 3 个开放阅读框: NS1、NP1 和 VP1/VP2, GenBank 登录号为 GU139423, 基因型为 HBoV1 型。该序列与已报道序列 DQ000496 氨基酸同源性达到 99%, 仅 16 个核苷酸发生变异, 大多位于易突变的衣壳蛋白编码区, 而 NP1 基因完全保守, 其他细小病毒中并未发现与 NP1 同源的蛋白。NP1 在 MVC 病毒 DNA 复制

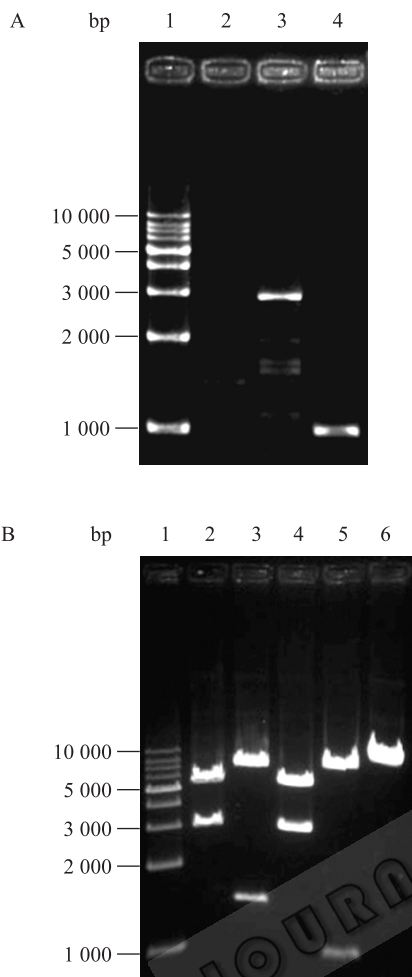


图 2 HBoV1 基因组 PCR 分段扩增 (A) 及重组载体的酶切鉴定 (B)

Fig. 2 PCR products of three segments (A) and recombinant plasmid identified by enzyme digestion (B). (A) 1: 1 kb DNA marker; 2-4: PCR product of fragments from a to c. (B) 1: 1 kb DNA marker; 2: pSK-a-b-c digested with *Sal* I and *Xba* I; 3: pSK-a-b-c digested with *Sal* I and *Hind* III; 4: pSK-a-b-c digested with *Hind* III and *EcoR* I; 5: pSK-a-b-c digested with *EcoR* I and *Xba* I; 6: pSK-a-b-c digested with *EcoR* I.

过程中发挥重要作用, 缺失 NP1 基因的 MVC 可由 HBoV1 或 BPV1 的 NP1 基因回补, 正常进行病毒 DNA 复制^[15]。对病毒基因组启动子区分析显示, 该启动子中心区域位于 146~196 nt, 距离 NS1 起始密码子仅 91 个核苷酸。该片段包含真核生物基因启动子的基本元件 TATA 盒、CAAT 框以及转录起始基序 (图 3), 这些元件是否具备功能还需进一步验证。

```

1  GCCGGCAGACATATTGGATTCCAAGATGGCGCATGTGCAACCACGTCACA
51  TATAAAATAATAATATTCACAAGGAGGAGTGGTTATATGATGTAATCCA
      CAAT box
101 TAACCACTCTCAGGAAATGACGTATGATAG CAAT CAGAATTGAGTATTA
      TATA box      Ins
151 AACCTATATAAGCTGCTGCACTTCTGATTCAA TCAGA TGCATCCGGTC
201 TCCGGCGAGTGAACATCTCTGGAAAAAGCTCCACGCTTGTTGGTGAGTCTA
251 CTNATG

```

图 3 HBoV1 启动子序列

Fig. 3 Nucleotide sequence of the HBoV1 promoter.

2.4 HBoV1 启动子重组载体的构建

以 WHL-1 质粒为模板, PCR 扩增 HBoV1 启动子序列 (1~252 nt), 凝胶电泳检测大小正确 (图 4A2), PCR 回收片段与 pGL3-Basic 载体连接, 酶切鉴定, 切下 250 bp 大小条带 (图 4A3), 与预期结果一致, 成功构建了 pGL3-Basic-pBoV 重组载体。以 pEGFP-N1 质粒为模板扩增 EGFP 基因片段, 大小为 719 bp (图 4B2), 通过双酶切用 EGFP 基因替换已构建载体 pGL3-Basic-pBoV 的 *luc* 报告基因, 酶切鉴定如图 3B3。以 pEGFP-N1 质粒为模板扩增 CMV 启动子区, 大小 589 bp (图 4C2), 成功构建阳性对照重组载体 pGL3-Basic-pCMV, 酶切鉴定如图 4C3。构建载体的测序工作由南京金斯瑞生物有限公司完成。

2.5 HBoV1 启动子活性检测

重组质粒 pGL3-pBoV-EGFP 转染试验细胞 24 h 后, 荧光显微镜观察细胞中 EGFP 蛋白的表达 (图 5), 以 pEGFP-N1 载体转染各试验细胞为阳性对照。所有试验细胞均检测到绿色荧光, 表明 HBoV1 启动子在哺乳动物细胞中启动下游报告基因 EGFP 的转录、表达。pEGFP-N1 是常用的带有 EGFP 标签的表达载体, 在 CMV 的启动下, 外源基因与 EGFP 融合表达, 在荧光显微镜下可直接观察蛋白表达。各细胞试验组与对照细胞组相比, 荧光强度相当甚至更强, 显示 HBoV1 启动子在哺乳动物中具有很强活性。293T、293G 和 PT 细胞试验组中表达荧光蛋白的细胞明显多于 WI-38AV、A-549、RK13 和 HeLa 细胞试验组, 原因在于 Lipofectamine Reagent 介导下对各种细胞转染效率不同。同时, 我们采用

荧光素酶检测系统对启动子活性定量检测，以 pGL3-Basic-pCMV 转染各种试验细胞测得发光值为 1，HBoV1 启动子在 4 种细胞中荧光素酶活性相对值见图 6，说明启动子在不同细胞中活性都比

CMV 启动子强 (荧光素酶相对活性都大于 1)。在 293T、HeLa、A-549 和 WI-38AV 细胞中，HBoV1 启动子活性分别是 CMV 的 4.5 倍、2.2 倍、1.4 倍和 1.1 倍。

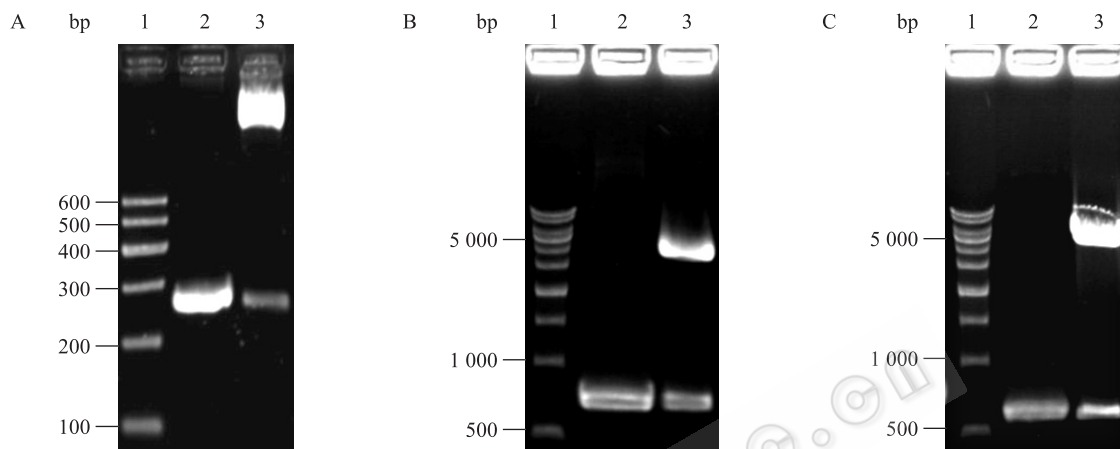


图 4 启动子重组载体的构建

Fig. 4 Construction of HBoV1 promoter vectors. (A) 1: DNA marker I; 2: PCR product of HBoV1 promoter; 3: pGL3-Basic-pBoV digested with *Bgl* II/*Hind* III. (B) 1: 1 kb DNA marker; 2: PCR product of EGFP; 3: pGL3-pBoV-EGFP digested with *Nco* I/*Xba* I. (C) 1: 1 kb DNA marker; 2: PCR product of CMV promoter. 3: pGL3-Basic-pCMV digested with *Bgl* II/*Hind* III.

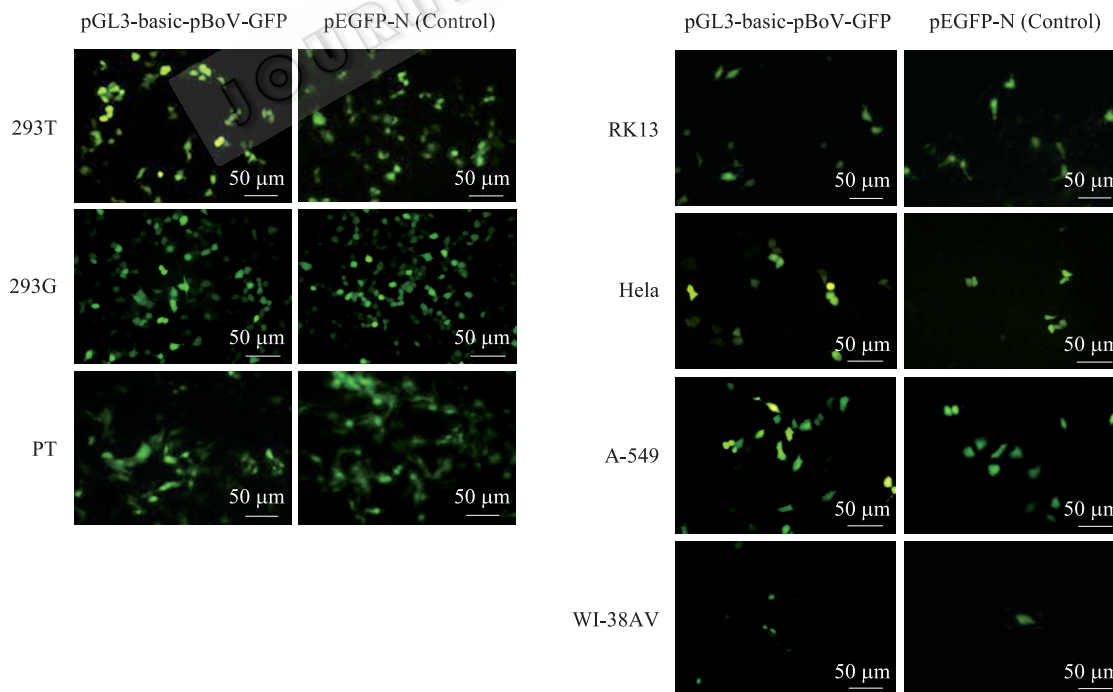


图 5 荧光显微镜检测 HBoV1 启动子下的 EGFP 在不同哺乳动物细胞中的表达

Fig. 5 Detection the EGFP expression by HBoV1 promoter function in different cell lines with fluorescence microscope (bar=50 μm).

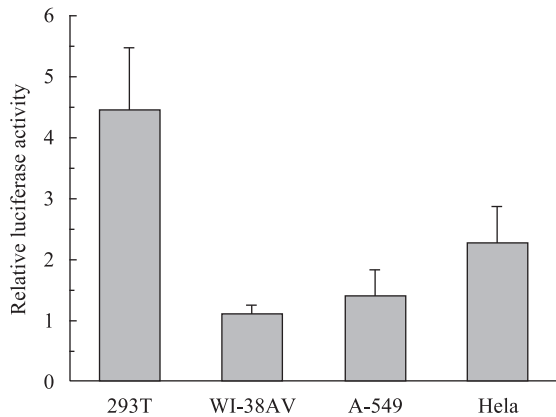


图 6 HBoV1 启动子在 4 种细胞中的活性比较

Fig. 6 Comparison of the strengths of HBoV1 promoter in different cell lines. The values were calculated by dividing the amount of relative luciferase activity driven by HBoV1 promoter. The activity of the CMV promoter was set at 1 in all cell types. The error bars indicate standard deviations of 3 experiments and each performed in triplicate.

3 讨论

人博卡病毒是近年来新发现的感染人类的细小病毒,最初是在患有呼吸道疾病的小儿鼻咽抽吸物中筛选出该病毒,且在世界范围内都有发现该病毒感染。近两年又在患有胃肠道疾病患者排泄物中鉴定出不同基因型的 HBoV。在成人的呼吸道分泌物中偶尔也能检测到人博卡病毒^[16]。本研究采集的标本来自患有呼吸道疾病的患儿,941 例痰液样本检测到 33 例 HBoV 阳性扩增产物,其中 1 岁以下婴幼儿患者占阳性样 72.7%,为人博卡病毒的易感人群,而有报道 5 岁儿童 90% 以上都具有人博卡病毒抗体^[17]。

本实验构建了人博卡病毒基因组克隆,对其测序并与已报道的序列比对发现,该博卡病毒属于 HBoV1 型。与其他细小病毒类似,博卡病毒基因组两端具有 ITR 结构,但迄今为止还未能得到该序列,也未见有相关报道。我们已构建的病毒重组载体 WHL-1 也只包括中间 5 299 nt 的大片段,由于缺乏 ITR 结构,采用 Southern blotting 方法,在转染 WHL-1 的 293T 细胞中并未检测到病毒 DNA 复制(结果未显示),进一步证明 ITR 结构对病毒复制是必需的。

由于未分离得到 HBoV 病毒粒子,感染性克隆的构建又受阻于 ITR 结构,对人类博卡病毒的研究多局限于流行病学研究。获得感染性克隆是研究病毒感染的分子机制的突破口,我们正进行这方面的工作。

人类博卡病毒唯一启动子位于基因组左端,由于缺乏 ITR 结构,启动子区是否会受到影响而无活性,能否在哺乳动物细胞中行使功能。我们将基因组左端 252 个核苷酸克隆到 pGL3-Basic 上,分别转染人类、猪、兔代表细胞系,结果显示,在这几类哺乳动物细胞中,HBoV1 启动子都具有活性,且在 293T 细胞中活性最强。首次证明 HBoV1 启动子在大多数哺乳动物细胞中具有较高活性,为深入研究博卡病毒转录和翻译机制提供了很好的平台。

REFERENCES

- [1] Allander T, Tammi MT, Eriksson M, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(36):12891-12896.
- [2] Vicente D, Cilla G, Montes M, et al. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(4): 636-637.
- [3] Allander T, Jartti T, Gupta S, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis*, 2007, 44(7): 904-910.
- [4] Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, et al. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis*, 2006, 194(9):1276-1282.
- [5] Manning A, Russell V, Eastick K, et al. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J Infect Dis*, 2006, 194(9): 1283-1290.
- [6] Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, et al. A newly identified bocavirus species in human stool. *J Infect Dis*, 2009, 199(2): 196-200.
- [7] Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, et al. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog*, 2009, 5(4): e1000391.

- [8] Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis*, 2010, 201(11): 1633–1643.
- [9] Dijkman R, Koekkoek SM, Molenkamp R, et al. Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells. *J Virol*, 2009, 83(15): 7739–7748.
- [10] Ozawa K, Ayub J, Hao YS, et al. Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. *J Virol*, 1987, 61(8): 2395–2406.
- [11] Liu ZW, Qiu JM, Cheng F, et al. Comparison of the transcription profile of simian parvovirus with that of the human erythrovirus B19 reveals a number of unique features. *J Virol*, 2004, 78(23): 12929–12939.
- [12] Qiu JM, Cheng F, Burger LR, et al. The transcription profile of aleutian mink disease virus (AMDV) in CRFK cells is generated by alternative processing of pre-mRNAs produced from a single promoter. *J Virol*, 2006, 80(2): 654–662.
- [13] Burnett E, Cotmore SF, Tattersall P, et al. Segregation of a single outboard left-end origin is essential for the viability of parvovirus minute virus of mice. *J Virol*, 2006, 80(21): 10879–10883.
- [14] Chen AY, Cheng F, Lou S, et al. Characterization of the gene expression profile of human bocavirus. *Virology*, 2010, 403(2):145–154.
- [15] Sun YN, Chen AY, Cheng F, et al. Molecular characterization of infectious clones of the minute virus of canines reveals unique features of bocaviruses. *J Virol*, 2009, 83(8): 3956–3967.
- [16] Longtin J, Bastien M, Gilca R, et al. Human bocavirus infections in hospitalized children and adults. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(2): 217–221.
- [17] Endo R, Ishiguro N, Kikuta H, et al. Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido prefecture, Japan *J Clin Microbiol*, 2007, 45(10): 3218–3232.

《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要：基本要素包括研究目的、方法、结果和结论（不用单列标题书写）。目的 (Purpose)：主要说明作者写此文章的目的，或说明本文主要要解决的问题；方法 (Methods)：重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要，可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果 (Results)：本文最后得出的结果（实验数据部分）。结论 (Conclusions)：如为基础研究，应写明本文的创新之处，及文章在讨论部分表述的观点；如为应用性研究，应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要：包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望，尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点：英文摘要的内容应与中文摘要一致，但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后，务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的，即使学术上可以达到刊出的水平，本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称，尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态，被动语态表达拖拉模糊尽量不用，这样可以免好多长句，以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句，避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态，语法正确，句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语，除非是那些人人皆知的（如DNA、ATP等），或者确实是非常长，而且出现多次的短语才允许用缩写语，并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中，不要使用任何汉字字符，包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。