

Preparation and Application of Antibodies against Antigen VP1-Unique of Human Bocavirus 1

Duo Xu, Wenkuan Liu*, Aiping You, Zhichao Zhou, Shuyan Qiu, Chi Li, Shujun Gu, Rong Zhou

State Key Laboratory of Respiratory Diseases, National Clinical Research Center for Respiratory Disease, Guangzhou Institute of Respiratory Health, The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Medical University, Guangzhou Guangdong
Email: *ahlwk2000-2004@163.com

Received: May 10th, 2018; accepted: May 24th, 2018; published: May 31st, 2018

Abstract

Human bocavirus 1 (HBoV1) is an important respiratory virus in the world, and its research is still in its early stages. In this study, the antigen VP1-unique (VP1u) of HBoV1 was expressed and purified using prokaryotic expression. The antibody was successfully obtained from immunized mice, and then evaluated by ELISA against the corresponding protein and clinical HBoV1-positive samples. The A450 value had 4-fold higher in the positive antibody than the negative control against clinical HBoV1-positive samples at 1:50 dilution. The antibody was successfully used in the immunofluorescence study of VP1u of HBoV1 Guangzhou strain (GU338055) reverse genetic system. In this study, we successfully prepared and evaluated antibody against antigen VP1u of HBoV1. The study provided an important tool for the further study of HBoV1.

Keywords

Human Bocavirus 1, VP1u, Antibody, Immunofluorescence

人博卡病毒1型独特区VP1u抗体制备及应用

许多, 刘文宽*, 游爱萍, 周志超, 邱淑燕, 李 焱, 辜淑君, 周 荣

呼吸疾病国家重点实验室, 国家呼吸系统疾病临床医学研究中心, 广州呼吸健康研究院, 广州医科大学附属第一医院, 广州医科大学, 广东 广州
Email: *ahlwk2000-2004@163.com

收稿日期: 2018年5月10日; 录用日期: 2018年5月24日; 发布日期: 2018年5月31日

*通讯作者。

文章引用: 许多, 刘文宽, 游爱萍, 周志超, 邱淑燕, 李焱, 辜淑君, 周荣. 人博卡病毒1型独特区VP1u抗体制备及应用[J]. 自然科学, 2018, 6(3): 237-245. DOI: 10.12677/ojns.2018.63034

摘要

人博卡病毒1型(human bocavirus 1, HBoV1)是全球流行的重要呼吸道病毒, 对其的研究尚处于初期阶段。本研究针对HBoV1的VP1独特区(VP1u)通过原核表达的方式进行蛋白表达, 并通过纯化、免疫小鼠成功获得了蛋白的抗体血清, 通过ELISA评价了抗体对相应蛋白及临床病毒阳性样品的效价, 并在后者发现制备抗体在1:50稀释时A450对阴性对照有4倍升高。利用所制备的抗体成功用于HBoV1广州株(GU338055)反向遗传系统的VP1u的免疫荧光研究中。本研究成功制备了HBoV1抗原VP1u抗体并应用, 为HBoV1后续深入研究提供了重要的工具, 具有重要意义。

关键词

人博卡病毒1型, VP1u, 抗体, 免疫荧光

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

人博卡病毒1型(Human bocavirus 1, HBoV1), 是 Allander 等人于 2005 年首次发现, 归属于细小病毒科, 细小病毒亚科, 博卡病毒属[1]。HBoV1 后被证实是一种全球流行的重要呼吸道病原体, 感染呼吸道可引起上、下呼吸道感染, 并常与其他病原体产生共感染[2] [3] [4]。HBoV1 本身是一种体积较小、具有二十面体衣壳、无包膜的单链线性 DNA 病毒, 病毒粒子直径约为 26 nm。目前仅有一例 HBoV1 完整基因组被测序, 其长度为 5543 nt (JQ923422), 其基因组序列、转录谱和表达谱分析表明, 其至少表达两种衣壳蛋白: VP1 和 VP2; 两种非结构蛋白 NS1 和 NP1。其中 VP1、VP2 分别有 672aa、542aa, 具有典型的基因重叠区, 其中 VP1-N 端为非重叠区, 长度为 129aa, 即 VP1 独特区(VP1-unique, VP1u)、后面为两个衣壳蛋白的重叠区(VP1/2), 长度 542aa, 序列完全相同[1] [5] [6]。HBoV1 由于其感染具有很强组织特异性, 有文献报道其与 AAV2/HBoV1 形成的嵌合病毒有作为肺囊性纤维化(cystic fibrosis, CF)基因治疗载体的潜质[7] [8]。研究表明 HBoV1 的 VP2 可独立形成病毒样颗粒(Virus-like particles, VLP) [9], 而 HBoV1 的 VP1u 区有磷脂酶 A2 样活性(Phospholipase A2-like activity), 可以破坏细胞紧密连接[10] [11], 可见 VP1u 在 HBoV1 的感染和组织特异性方面可能都起到重要的作用。

为进一步对 HBoV1 进行深入研究, 本研究针对 VP1u 区进行原核表达、纯化并通过免疫小鼠获得其抗体, 为后续 HBoV1 感染研究奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. HBoV 广州株 VP1u 片段扩增

1) 主要抗原片段 PCR 引物设计

本研究针对前期获得的来源于 60 岁女性肺炎患者的 HBoV1 广州株(Access number: GU338055)进行抗原 VP1u (aa 1-129)片段 PCR 引物设计, 产物长度 390 bp。

其中正向引物 VP1u-gst-SalIF 为 5'-AAAGTCGACATGCCTCCAATTAAGAGACAGCCTA-3';

反向引物 VP1u-gst-NotIR 为 5'-AAAGCGGCCGCTTATGAGGTTCTGGTTTAGGTTCACTC-3'。

2) 扩增条件: 使用 HBoV1 广州株(Access number: GU338055)构建的反向遗传系统全长质粒 (pHBoV-S2)作为模板, 使用 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 25 μ l 体系(Takara)对 VP1u 目标片段进行扩增反应

pHBoV-S2 模板(质粒)	0.5 μ l
PrimeSTAR Max Premix (2 \times)	12.5 μ l
正向引物(10 μ M)	1 μ l
反向引物(10 μ M)	1 μ l
ddH ₂ O	补足至 25 μ l

反应条件如下: 预变性 94°C 5 min; 循环条件(30 \times): 98°C 10 sec、55°C 15 sec、72°C 30 sec; 延伸温度 72°C 5 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 2 μ l 扩增产物。

3) 扩增产物纯化: 使用 Axygen® AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit(爱思进生物技术(杭州)有限公司)进行目标 DNA 的凝胶回收及纯化。

2.2. 原核表达载体构建、蛋白表达及纯化

2.2.1. 利用 pGEX-4T-3 质粒构建 HBoV1 VP1u 原核表达载体 pGEX-VP1u。

1) 质粒与纯化的扩增片段酶切

使用 *Sal* I 和 *Not* I(NEB)对 pGEX-4T-3 及 PCR 扩增的 VP1u 片段进行双酶切, 50 μ l 酶切条件如下:

NEBuffer 3.1	5 μ l
酶切目标核酸	15 μ l
<i>Sal</i> I	1 μ l
<i>Not</i> I	1 μ l
ddH ₂ O	补足至 50 μ l

至 37°C 水浴中 2 h 后, 使用 Axygen® AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit 进行目标 DNA 的凝胶回收及纯化。

2) 连接

使用 T4 DNA ligase (NEB)连接酶切的 pGEX-4T-3 与 VP1u 的双酶切产物, 构建原核表达载体 pGEX-VP1u。10 μ l 连接条件如下:

T4 DNA ligation buffer	1 μ l
pGEX 4T3 酶切产物	4 μ l
VP1u 酶切产物	4 μ l
T4 DNA ligase	1 μ l

至于 16°C 中 2 h。

3) 转化

使用 *E. coli* TOP10 感受态细胞(天根生化科技(北京)有限公司)转化连接产物, 步骤如下: 冰上融化感

受态细胞, 吸取连接产物至感受态中, 冰浴 30 min, 42°C 热激 45 sec, 迅速转至冰浴 2 min, 加入无抗性 LB 培养基 500 μ l 至 37°C 摇床中 250 rpm 1 h, 取 200 μ l 涂布氨苄青霉素 LB 固体平板(LB-Amp+平板), 37°C 培养箱中倒置过夜培养。

4) 挑取单菌落并验证

挑取平板上的单菌落至含 0.8 ml LB-Amp+液体培养基的 1.5 ml 离心管中, 37°C 摇床中 250 rpm 培养 4~5 h, 使用菌落 PCR 进行阳性克隆筛选, 即使用前述 VP1u 扩增引物 VP1u-gst-SalIF/VP1u-gst-NotIR1 中各片段扩增引物进行分别验证。菌落 PCR 条件如下:

单菌落培养物	0.5 μ l
Premix Taq (TaKaRa Taq Version 2.0 plus dye)	12.5 μ l
正向引物(10 μ M)	1 μ l
反向引物(10 μ M)	1 μ l
ddH ₂ O	补足至 25 μ l

反应条件: 预变性 95°C 5 min; 循环条件(30 \times): 94°C 30 sec、55°C 30 sec、72°C 30 sec; 延伸温度 72°C 5 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段。挑选 2 例测序验证。

5) 使用 AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒(Axygen)提取最终确认正确的 pGEX-VP1u。使用 0.5 μ l 提取质粒转化 *E. coli* BL21 感受态细胞(天根生化科技(北京)有限公司), 方法同前述。

2.2.2. 蛋白表达及纯化

1) 蛋白表达

使用 IPTG (Sigma)诱导蛋白表达, 为获得可溶性蛋白, 调整 IPTG 浓度、诱导时间、诱导温度, 但最终目标蛋白未能获得可溶性目标蛋白, 使用 KCL 染色切胶回收目标蛋白。步骤如下: 挑取 pGEX-VP1u 阳性 *E. coli* BL21 接种至 10 ml LB-Amp+液体培养基, 37°C 摇床中 220 rpm 培养过夜; 将培养物接种至 100 ml LB-Amp+液体培养基中, 37°C 摇床中 220 rpm 培养 1~2 h, 加入 IPTG 进行蛋白诱导表达; 诱导条件为: IPTG 终浓度 0.8 mM、37°C 220 rpm 诱导 5 h。

2) 蛋白纯化

5000 rpm 4°C 离心 15 min 收集菌体, 加入 10 ml PBS 重悬细菌, 使用冰上超声破碎细菌(20 sec 开、5 sec 停、70%功率、10~20 min)至菌液变青色。10,000 rpm 4°C 离心 30 min 弃上清。沉淀中加入 8 ml PBS 重悬沉淀, 加入 2 ml 5 \times SDS 上样缓冲液, 100°C 变性 5 min, 10,000 rpm 4°C 离心 30 min 获得上清。使用上清进行 SDS-PAGE, 用经过预冷的 0.25M KCL 对蛋白胶进行染色(目标条带呈白色)。用干净的刀片切下目标条带, 在蒸馏水中润洗脱盐, 取出至干净的管中。剪碎凝胶, 加入过量 PBS, 放入 4°C 冰箱中过夜。第二天收集浸泡液(吸之前振荡), 再加入 PBS 4°C 过夜浸泡收集一次。使用 10KD 超滤管(Millipore)浓缩目标蛋白; 12% SDS-PAGE 检测目标蛋白, Bradford 法检测蛋白浓度。

2.3. 小鼠免疫及效价检测

1) 目标蛋白使用 100 μ l 完全弗氏佐剂(Sigma)与 100 μ l 含 50 μ g 目标蛋白充分乳化, 腹腔注射 BALB/c 六周龄小鼠, 总计 4 次免疫。免疫后取血清。

2) 使用制备的抗原及临床 HBoV1 阳性样品分别进行 ELISA 抗体评价。将所用抗原用包被液稀释到 2.5 μ g/ml(制备的蛋白抗原)或使用确认的临床病毒阳性样品, 酶标板每孔加入 100 μ l, 置 4°C, 24 h 包被; 弃去孔中液体, 使用 150 μ l 封闭液 37°C 封闭 2 h; 弃去孔中液体并洗涤 5 次, 每次 3 min; 加入不同稀释

梯度的血清样品进行检测, 使用未免疫小鼠血清作为阴性对照, 置于 37°C, 30 min。用洗涤液满孔洗涤 5 遍, 每遍 3 min; 加入酶标抗体(HRP-羊抗鼠)37°C, 30 min 之间; 洗涤 5 次后使用 TMB-过氧化氢尿素溶液底物反应(Millipore), 37°C 避光放置 3~5 min, 加入终止液显色, 测 A450。

2.4. 抗体在 HBoV1 免疫荧光实验中的应用

使用所制备的 VP1u 抗体血清对转染 HBoV1 反向遗传系统全长质粒 pHBoV-S2 的 AD293 细胞进行免疫荧光实验。

1) 提前一天于 24 孔板中接种 AD293 细胞, 使用 Lipofectamine 3000 化转试剂转染质粒至细胞, 转染后在 37°C 5% CO₂ 培养箱中培养 72 h。

2) 使用所制备抗体进行 VP1u 的免疫荧光检测。步骤如下: 24 孔板中细胞 PBS 浸洗 3 次, 每次 3 min; 用 4% 的多聚甲醛固定 15~30 min, PBS 浸洗孔 3 次, 每次 3 min; 0.5% Triton X-100 (PBS 配制) 室温通透 20 min; PBS 浸洗孔 3 次, 每次 3 min, 吸干 PBS, 在孔中加正常 10% 山羊血清, 室温封闭 30 min; 吸掉封闭液, 每孔加足够量的稀释好的所制备的一抗血清(1:50), 并使用阴性小鼠血清作为阴性对照, 放入湿盒, 37°C 1 h; PBST 浸洗孔 3~6 次, 每次 3 min, 吸干孔中多余液体后滴加稀释好的荧光二抗(FITC-羊抗鼠) (联科生物), 湿盒中 37°C 孵育 1 h, PBST 浸洗孔 3 次, 每次 3 min; (注意: 从加荧光二抗起, 后面所有操作步骤都尽量在较暗处进行)。吸干孔中的液体, 用含抗荧光淬灭剂的封片液封片, 然后在荧光显微镜下观察采集图像。

3. 实验与结果

3.1. HBoV1 VP1u 片段原核表达载体构建

实验通过 PCR 获得了 VP1u 的目标片段(图 1), 并利用 pGEX-4T-3 构建了原核表达载体 pGEX-VP1u(图 2), 并最终通过测序验证正确。

3.2. 蛋白表达与纯化

通过 KCL 染色切胶回收, 获得 VP1u 目标蛋白(GST-VP1u 融合蛋白分子量为 40.2KD) (图 3), 浓度

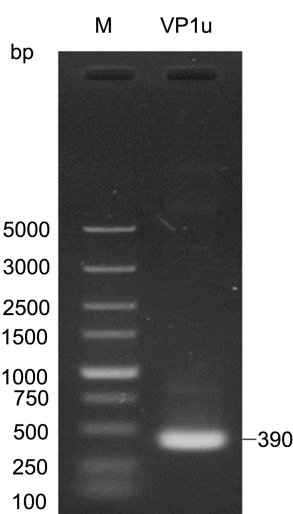


Figure 1. The DNA fragments of HBoV1 antigen VP1u; M: DNA marker

图 1. HBoV1 抗原 VP1u DNA 扩增产物; M: DNA marker

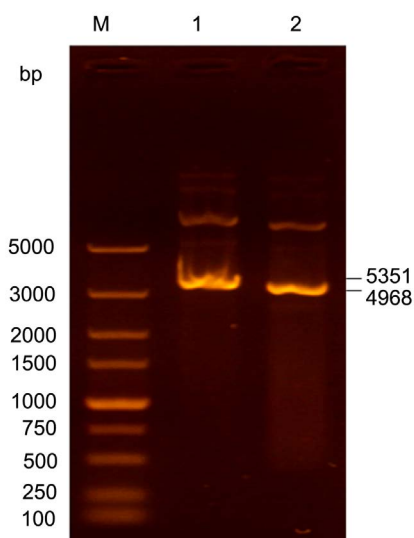


Figure 2. Construction of prokaryotic expression plasmids for HBoV1 antigen VP1u; M: DNA marker; 1: pGEX-VP1u; 2: pGEX-4T-3

图2. HBoV1 VP1u原核表达载体构建;M:DNA marker; 1: pGEX-VP1u; 2: pGEX-4T-3

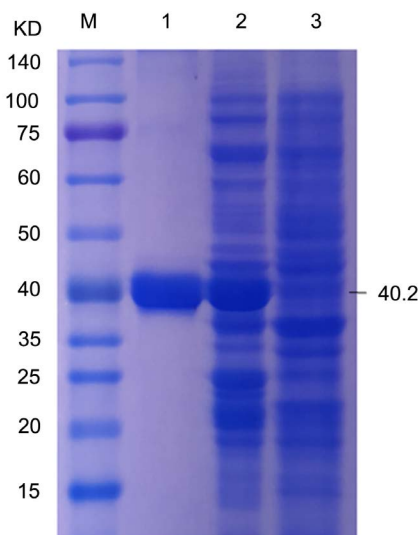


Figure 3. SDS-PAGE test for proteins of HBoV1 VP1u; M: Protein marker; 1: GST-VP1u fusion protein; 2: IPTG-induced *E.coli* BL21-VP1u; 3: Non-IPTG-induced *E.coli* BL21-VP1u

图3. HBoV1 VP1u 蛋白 SDS-PAGE;M: Protein marker; 1: GST-VP1u 融合蛋白; 2: IPTG 诱导菌; 3: IPTG 未诱导菌

为 1.055 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

3.3. 免疫与抗体效价

通过免疫 BALB/c 小鼠，获得一批免疫血清，分别使用蛋白抗原和阳性临床标本对其进行评价(表 1)

(表 2)。与阴性小鼠血清对比 2 倍以上升高的稀释度起始于 1:1,000,000；使用阳性样品进行的评价表明，其在 1:50 情况下约有 4 倍升高。

3.4. 抗体在 HBoV1 免疫荧光实验中的应用

使用制备的抗体,对利用反向遗传系统制备的 HBoV1 进行主免疫荧光检测(图 4)。实验结果显示 VP1u 在细胞中的分布。

4. 讨论

HBoV1 是全球流行的重要呼吸道病原体,由于其很难获得纯培养病毒,对其的研究还处于初始阶段,更无相应的动物模型建立,所以对其感染及致病的机制还需更多的研究。目前体外研究表明感染 HBoV1 后可导致分化的组织样支气管上皮细胞(HAE)的纤毛减少、紧密连接遭到破坏、细胞肥大,这些特点与肺损伤的组织变化非常相似[5],在一定程度上解释了 HBoV1 的致病机制,而研究表明 VP1u 的磷脂酶 A2 样活性(Phospholipase A2-like activity)具有损坏紧密连接的作用[10] [11],说明了 VP1u 在病毒致病中

Table 1. A450 values at different serum dilutions in ELISA using protein antigen

表 1. 蛋白抗原 ELISA 检测不同血清稀释度下的 A450 值

蛋白抗原	血清稀释度				阴性对照 (1:50)
	1:1000	1:10,000	1:100,000	1:100,000	
VP1u	3.80 ± 0.14	3.56 ± 0.37	1.70 ± 0.34	0.25 ± 0.07	0.04 ± 0.003

注: 实验设置 3 个平行复孔, 数据为 A450 值 Mean ± SD。Note: The experiment set three parallel tests, the data for the A450 value Mean ± SD.

Table 2. A450 values at different serum dilutions in ELISA using clinical HBoV1-positive sample antigen

表 2. 临床 HBoV1 阳性样品 ELISA 验证不同血清稀释度下的 A450 值

HBoV1 阳性标本	血清稀释度			阴性对照 (1:50)
	1:50	1:500	1:5000	
1:25	0.23 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01
1:50	0.28 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01
1:100	0.23 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01

注: 实验设置 3 个平行复孔, 数据为 A450 值 Mean ± SD。Note: The experiment set three parallel tests, the data for the A450 value Mean ± SD.

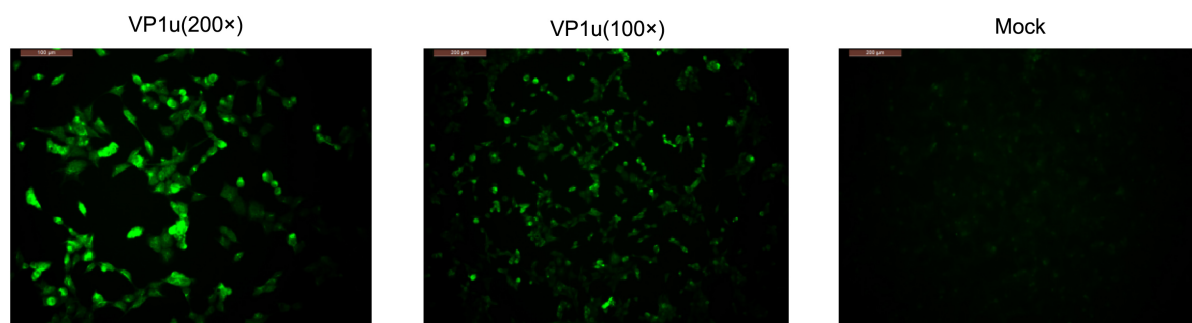


Figure 4. Immunofluorescence detection of HBoV1 antigen VP1u using antibody preparation. Note: Using 1:50 dilution of the preparation antibody as primary antibody, using negative mouse serum as a primary control, using FITC-goat anti-mouse antibody as secondary antibody.

图 4. 利用制备抗体对 HBoV1 抗原 VP1u 进行免疫荧光检测。注: 使用 1:50 稀释的制备抗体作为一抗, 使用阴性小鼠血清作为一抗对照, 使用 FITC-羊抗鼠抗体作为二抗。

的重要作用。HBoV1 的感染对气道上皮细胞的纤毛和紧密连接的破坏, 可能导致人体防御外来侵害的第一道防线遭到破坏, 可能导致人体对外部病原体更加易感, 也一定程度上解释了 HBoV1 存在的高共感染率。这些证据表明 HBoV1 感染的影响可能不仅仅局限于自身导致疾病的产生, 同时也在于导致其他病原体易感。

本研究针对 HBoV1 VP1u 进行抗体制备。研究利用 pGEX-4T-3 质粒成功构建了 pGEX-VP1u 表达载体(图 1、图 2), 并通过诱导表达获得目标蛋白(图 3)。实验通过腹腔免疫小鼠获得抗体血清, 并分别利用目标蛋白和临床阳性标本评价抗体效价(表 1、表 2)。在利用阳性标本进行的评价中, 三种血清 1:50 稀释后, A450 均可获得 4 倍提升(表 2), 说明所制备的抗体可以满足用于后续的实验应用。为进一步验证抗体的效果, 实验针对 HBoV1 广州株反向遗传系统转染制备的病毒进行免疫荧光检测(图 4), 获得了良好的效果, 证明了其具有良好的应用效果。

本研究针对 HBoV1 VP1u 抗原进行了抗体制备, 实验证明所制备抗体具有良好的效果, 为 HBoV1 的研究提供了重要的工具, 为其后续研究奠定重要的基础。

基金项目

国家自然科学基金-青年基金项目(31500143); 国家“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项(2018ZX10102001, 2017ZX10103011)。

参考文献

- [1] Allander, T., Tammi, M.T., Eriksson, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A. and Andersson, B. (2005) Cloning of a Human Parvovirus by Molecular Screening of Respiratory Tract Samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 12891-12896. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504666102>
- [2] Schlaberg, R., Ampofo, K., Tardif, K.D., Stockmann, C., Simmon, K.E., Hymas, W., Flygare, S., Kennedy, B., Blaschke, A., Eilbeck, K., Yandell, M., McCullers, J.A., Williams, D.J., Edwards, K., Arnold, S.R., Bramley, A., Jain, S. and Pavia, A.T. (2017) Human Bocavirus Capsid Messenger RNA Detection in Children with Pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases*, **216**, 688-696. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix352>
- [3] Nascimento-Carvalho, A.C., Vilas-Boas, A.L., Fontoura, M.H., Xu, M., Vuorinen, T., Soderlund-Venermo, M., Ruuskanen, O. and Nascimento-Carvalho, C.M. (2018) Serologically Diagnosed Acute Human Bocavirus 1 Infection in Childhood Community-Acquired Pneumonia. *Pediatric Pulmonology*, **53**, 88-94. <https://doi.org/10.1002/ppul.23891>
- [4] Pinana, J.L., Madrid, S., Perez, A., Hernandez-Boluda, J.C., Gimenez, E., Terol, M.J., Calabuig, M., Navarro, D. and Solano, C. (2017) Epidemiologic and Clinical Characteristics of Coronavirus and Bocavirus Respiratory Infections after Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Prospective Single-Center Study. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, **24**, 563-570. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.11.001>
- [5] Huang, Q., Deng, X., Yan, Z., Cheng, F., Luo, Y., Shen, W., Lei-Butters, D.C., Chen, A.Y., Li, Y., Tang, L., Soderlund-Venermo, M., Engelhardt, J.F. and Qiu, J. (2012) Establishment of a Reverse Genetics System for Studying Human Bocavirus in Human Airway Epithelia. *PLoS Pathogens*, **8**, e1002899. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002899>
- [6] Babkin, I.V., Tyumentsev, A.I., Tikunov, A.Y., Zhirakovskaia, E.V., Netesov, S.V. and Tikunova, N.V. (2015) A Study of the Human Bocavirus Replicative Genome Structures. *Virus Research*, **195**, 196-202. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.10.019>
- [7] Yan, Z., Keiser, N.W., Song, Y., Deng, X., Cheng, F., Qiu, J. and Engelhardt, J.F. (2013) A Novel Chimeric Adeno-associated Virus 2/Human Bocavirus 1 Parvovirus Vector Efficiently Transduces Human Airway Epithelia. *Molecular Therapy*, **21**, 2181-2194. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.92>
- [8] Flotte, T.R. (2017) Adeno-Associated Virus-Human Bocavirus 1 Chimeric Vectors: Ferreting Out Their Role in Airway Gene Therapy. *Human Gene Therapy*, **28**, 611. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.29047.trf>
- [9] Lindner, J., Karalar, L., Zehentmeier, S., Plentz, A., Pfister, H., Struff, W., Kertai, M., Segerer, H. and Modrow, S. (2008) Humoral Immune Response against Human Bocavirus VP2 Virus-Like Particles. *Viral Immunology*, **21**, 443-449. <https://doi.org/10.1089/vim.2008.0045>
- [10] Chiu, C.C., Shi, Y.F., Yang, J.J., Hsiao, Y.C., Tzang, B.S. and Hsu, T.C. (2014) Effects of Human Parvovirus B19 and

Bocavirus VP1 Unique Region on Tight Junction of Human Airway Epithelial A549 Cells. *PLoS One*, **9**, e107970.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107970>

- [11] Qu, X.W., Liu, W.P., Qi, Z.Y., Duan, Z.J., Zheng, L.S., Kuang, Z.Z., Zhang, W.J. and Hou, Y.D. (2008) Phospholipase A2-Like Activity of Human Bocavirus VP1 Unique Region. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **365**, 158-163. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.164>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2330-1724, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: ojs@hanspub.org