维普资讯 http://www.cqvip.com



论著 文章编号:0253-3626(2007)05-0455-04

# 人类偏肺病毒 F 基因真核表达质粒的构建及表达

张 琴,赵晓东,毛华伟,杨锡强

(重庆医科大学附属儿童医院 P2 实验室,重庆 400014)

【摘 要】目的:构建人类偏肺病毒融合蛋白(F)基因的真核表达质粒,并在昆虫细胞 sf-9 中表达。方法:采用 RT-PCR 法扩增人类偏肺病毒 A 亚型 CAN97-83 F 基因的全长序列,将其插入供体质粒 pFastBacHT 载体多克隆位点区,经酶切鉴定后转化大肠杆菌 DH10bac。供体质粒与受体杆粒(Bacmid)发生位点特异性转座获得重组的杆粒。采用脂质体将重组杆粒转染进昆虫细胞 sf-9,包装获得感染性杆状病毒。用此病毒感染 sf-9 细胞并表达蛋白,经 6×His 树脂纯化后用免疫印迹法验证表达蛋白。结果:PCR 及序列分析证实所获得的重组杆粒包含 hMPV 全长 F 基因序列,被重组杆状病毒感染的昆虫细胞 sf-9 显示典型细胞病变。采用抗 6×His 单克隆抗体为一抗,免疫印迹法检测到分子量约 70ku 的较单一的蛋白条带,证实 F 蛋白表达成功。结论:杆状病毒是一高通量、目标蛋白抗原性保存完好的表达系统。采用这一系统成功表达的 hMPV F 蛋白,将为我国 hMPV 血清流行病学和免疫发病机理研究奠定基础。

【关键词】人类偏肺病毒;融合蛋白;真核表达;杆状病毒

【中国图书分类法分类号】R725.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-10-18

# Eukaryotic expression of human metapneumovirus fusion protein in insect cells by using a baculovirus system

*ZHANG Qin, et al*

(*P2 Laboratory, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the eukaryotic recombinant bacmid containing fusion protein gene of human metapneumovirus and express it in insect cells. *Methods*: The full-length fusion protein gene of human metapneumovirus was amplified by reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR). After inserted at the multiple clone site of donor plasmid, pFastBacHT, target gene was delivered to bacmid to yield a recombinant bacmid. This recombinant bacmid was subsequently packaged in sf-9 cells and infectious recombinant baculovirus was used to inoculate fresh sf-9 cells to express fusion protein. Expressed protein was purified by using a 6×His tag rasin and identified by western blotting. *Result*: Nucleotide sequence analysis of PCR products amplified from rBacmid-hMPVF showed 100% identity to public sequence of CAN 97-83 F gene sequence. Sf-9 cells infected by recombinant baculovirus displayed typical cytopathic effects. By using 6×His tag monoclonal antibody and western blotting, a single band with molecular weight around 70ku was identified. *Conclusion*: The fusion protein of hMPV is successfully expressed by using baculovirus expression system in insect cells, which will benefit the study on sero-epidemiology and pathogenesis of hMPV infection in the future.

【Key words】Human metapneumoviru; Fusion protein; Eukaryotic expression; Baculovirus

人类偏肺病毒(Human metapneumovirus,hMPV)是荷兰学者于 2001 年首先分离获得的人类新病毒病原[1],目前为偏肺病毒属中唯一的人类病毒。hMPV 为单股负链 RNA 病毒,基因组结构为 3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5',编码 9 个蛋白质[2]。其中,融合蛋白(F)是肺炎病毒亚科所有成员均具有的膜表面糖蛋白分子,表达于被感染细胞或病毒颗粒表面,是病毒粘附并感染靶细胞的主要功能分子,在致病机制中扮演重要的角色。迄今国内尚未见 hMPV 融合蛋白真核表达的报道。昆虫杆状病毒表达载体系统(Baculovirus expression vector system,BEVS)自 20 世纪 80 年代初问世以来,已被公认为当今基因工程四大表达系统之一,具有安全、高效、表达产物与天然蛋白在结构及功能上相似等特点[3]。因此,我们采用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统在昆

作者介绍:张 琴(1977- ),女,博士生,主要研究方向:小儿感染与临床免疫。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(NO.30571976)。

维普资讯 http://www.cqvip.com



虫细胞中真核表达 F 蛋白，为今后 hMPV 感染的血清流行病学和免疫发病机制研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 hMPV 全长 F 基因片段的制备

1.1.1 引物设计与合成 根据 hMPV A 亚型 CAN97-83 F 基因序列，设计扩增全长 F 基因引物。上游引物为 5'-GGATCCGAATTCATGTCTTGGAAAGTGGTGA-3'，含有酶切位点 *BamH*I 和 EcoRI；下游引物为 5'-GGTACCGCATGCC-TAATTATGTGGTATGAAGC-3'，含有酶切位点 KphI 和 SphI。扩增目标产物 1630bp。引物由 Invitrogen 公司合成。

1.1.2 RT-PCR 用 hMPV A 亚型 CAN97-83 病毒感染 LLC-MK2 细胞，当细胞病变(Cytopathic effect，CPE)达+++时，用 Trizol 试剂(Invitrogen)提取 RNA，Omniscript 逆转录酶(QIAGEN 公司)合成 cDNA。PCR 反应体系为 50μl，10×PCR buffer 5μl，$MgCl_2$ 3μl，dNTP(各 2.5mmol/L each)4μl，上下游引物(25pmol/μl)各 1μl，cDNA 2μl，Tag 聚合酶 0.25μl，$DH_2O$ 补足 50μl(PCR 试剂均购自 Takara)。反应条件为：94℃预变性 30s，52℃退火 30s，72℃延伸 30s，循环 35 次后 72℃延伸 10min。扩增产物用 1.5%低熔点琼脂糖凝胶电泳分离，并用 PCR 产物凝胶回收试剂盒(QIAGEN)纯化回收，用 BamHI 和 KpnI 双酶切(Promega)，纯化并进行紫外定量。

### 1.2 质粒构建

1.2.1 质粒构建 将 pFastBacHT 质粒载体 (Invitrogen)用 *BamH*I 和 KpnI 双酶切，回收大片段，紫外定量。酶切处理的 PCR 产物与载体片段按摩尔比 8:1 进行连接 (连接酶购自 Promega)。连接产物转化感受态细菌 DH5α，37℃，过夜。次日挑取 LB 平板上生长的单个菌落，转至 LB 液体培养基中，37℃，250r/min 震摇培养 12h，质粒小量抽提试剂盒(上海生物工程有限公司)抽提质粒，按说明书操作。连接与转化操作均参考《分子克隆(实验指南)》进行。

1.2.2 重组供体质粒 rpFastBacHT-hMPVF 双酶切鉴定 将抽提的质粒用 *BamH*I 和 KpnI 双酶切，酶切产物 0.8%琼脂糖凝胶电泳。

### 1.3 制备重组穿梭质粒 rBacmid-hMPVF

1.3.1 转化感受态细菌 DH10Bac 将鉴定的具有正确插入目的基因片段的 rpFastBacHT-hMPVF 质粒转化感受态细菌 DH10Bac，具体操作按 Invitrogen 公司产品说明书进行。rpFastBacHT-hMPVF 质粒在 DH10Bac 大肠感菌中与杆状病毒穿梭载体(Bacmid)发生位点特异性转座。

1.3.2 获得重组穿梭质粒 rBacmid-hMPVF 在 LB 平板(含有庆大霉素，卡那霉素，四环素以及 Bluo-gal、IPTG)上挑取白色单一生长菌落，接种于液体 LB 培养基(含有庆大霉素，卡那霉素，四环素以及 Bluo-gal、IPTG)中进行扩增，小量质粒抽提试剂盒(Invitrogen)抽提质粒，按说明书操作。

1.3.3 重组穿梭质粒 rBacmid-hMPVF 鉴定 由于杆粒分子量过大，无法进行酶切鉴定。故从 DH10Bac 中抽提的重组杆粒为模板，用 M13 噬菌体引物扩增重组杆粒中 F 蛋白目的基因。引物序列为 M13f:5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'；M13r:5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3'。PCR 产物用 ABI3100 自动测序仪进行序列测定，用 DNAsis2.0 分析测序结果。

### 1.4 重组杆状病毒的产生

1.4.1 sf-9 昆虫细胞的培养 sf-9 细胞购自武汉大学病毒保藏中心。培养基采用 sf-900 Ⅱ SFM 无血清昆虫培养基(Invitrogen)，并置于 27℃，无 $CO_2$ 的培养箱中培养及传代。

1.4.2 转染 sf-9 昆虫细胞 sf-9 昆虫细胞接种于 6 孔板，$9\times10^5$/孔，待细胞贴壁 1h 后，采用脂质体转染试剂 Cellfectin (Invitrogen)按说明书进行转染。每孔细胞脂质体用量为 6μl，质粒为 1μg。72h 后待 CPE 明显时收获杆状病毒冻存于 4℃或-80℃备用。

1.4.3 扩增重组杆状病毒 rBacmid-hMPVF 转染 sf-9 细胞后，每天观察细胞形态，待 CPE 明显时，收集含重组杆状病毒颗粒的培养上清液，4℃ 1000g，离心 5min 去除细胞碎片，上清即为第一代重组杆状病毒。P1 病毒经连续多次感染 sf-9 细胞以提升重组杆状病毒滴度。

### 1.5 重组蛋白的表达、纯化及鉴定

用高滴度的重组杆状病毒感染新鲜 sf-9 细胞以表达目标蛋白。sf-9 细胞接种 6 孔板，$2\times10^6$/孔，细胞贴壁 1h 后，重组杆状病毒感染 sf-9 细胞，40μl/孔。72h 后，观察有明显 CPE 出现，细胞刮刀刮下细胞，4℃1000g，离心 5min，弃上清。细胞沉淀-80℃保存。因表达的重组蛋白为 N 端带有 6×His Tag 的融合蛋白，因此采用固化金属离子亲和层析法(Immobilized metal affinity chromatography，IMAC)纯化蛋白。细胞沉淀经液氮和 42℃水浴反复冻融后，采用金属离子亲和树脂纯化试剂盒(Clontech)纯化目标蛋白，操作按说明书进行。含有目标蛋白的洗脱液经 12%的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，然后转移至硝酸纤维膜上。硝酸纤维膜分别经 5%脱脂奶粉封闭，1:2000 稀释的抗 6×His 鼠单克隆抗体(一抗，北京天为时代公司)及 1:2000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(二抗，Senta Cruz)孵育后，经化学发光试剂盒检测(PIERCE)。

## 2 结 果

### 2.1 rpFastbacHT-hMPVF 质粒酶切结果

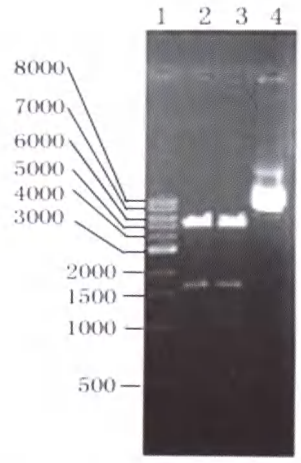
将供体质粒 rpFastbacHT-hMPVF 用 *BamH* Ⅰ和 Kph Ⅰ双酶切，酶切产物电泳结果如图 1。可见重组质粒双酶切后产生两片断，大小分别约为 1630bp 和 5000bp 大小的片段，证明质粒含有特异的插入片断。质粒命名为 rpFastbacHT-hMPVF。

### 2.2 rBacmid-hMPVF PCR 鉴定及序列分析

根据质粒 Bacmid 和插入片段大小，用 M13(+)/

维普资讯 http://www.cqvip.com





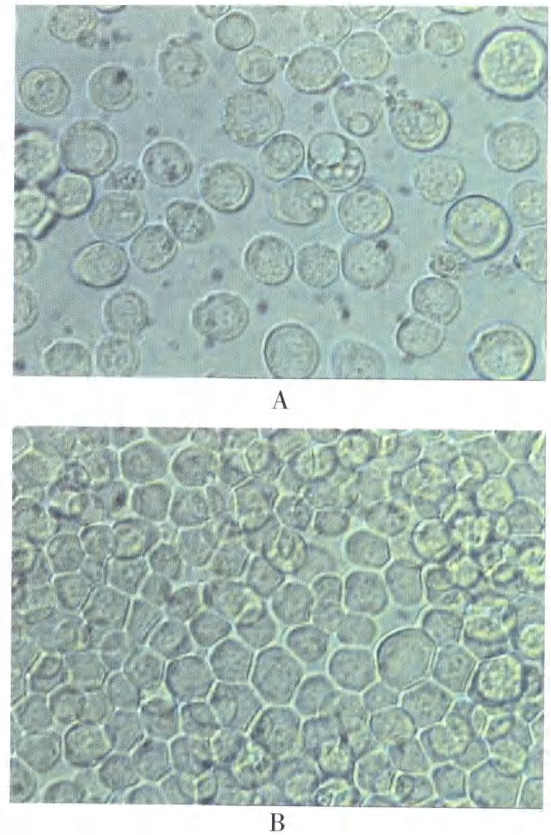

1:DNA marker;2:rpFastbacHT-hMPVF clone1:degested with BamHI and KphI;3:rpFastbacHT-hMPVF clone2:degested with BamHI and KphI;4:uncut rpFastbacHT-hMPVF

**图 1 质粒 rpFastbacHT-hMPVF 酶切鉴定电泳结果**

(-)引物应扩增出约 4060bp 大小的片段,其中包含杆粒载体片断 2430bp 和目的基因片断 1630bp。用 F 基因引物进行序列测定,测序结果与 CAN97-83 发表序列(核苷酸收录号 AY145296)100%同源,证实插入的目的基因无突变。

2.3 重组杆状病毒的包装及扩增

重组穿梭质粒 rBacmid-hMPVF 经脂质体转染试剂转染 sf-9 细胞,27℃孵育 3 天,可见细胞增大及颗粒增多,提示重组病毒包装成功。收获上清,获得重组杆状病毒原液,连续感染 sf-9 细胞 3 次进行扩增,传至第四代时,可观察到 sf-9 明显的细胞病变:细胞变大、变圆,胞浆颗粒增多,细胞核增大,病毒芽殖,细胞逐渐裂解脱落;而正常 sf-9 细胞生长良好,无此典型 CPE 出现。见图 2。

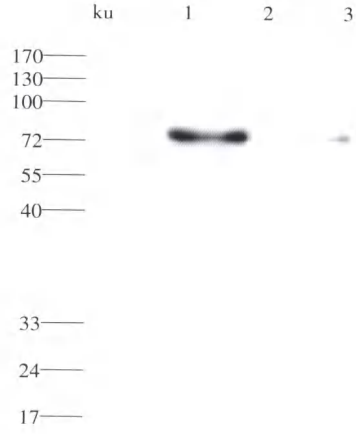


A 未感染杆状病毒的 sf-9 细胞;
B 感染杆状病毒 48h 后的 sf-9 细胞

**图 2 重组杆状病毒所致的 sf-9 细胞病变**

2.4 表达蛋白的鉴定

如图 3 所示,重组杆状病毒感染的 sf-9 细胞制备的裂解液经树脂纯化洗脱后,洗脱液 1 和洗脱液 2 内均可检测到大小约 70ku 的较单一条带。




1:阴性对照(未感染杆状病毒的 sf-9)
2:洗脱液 1
3:洗脱液 2

**图 3 Western bolt 鉴定重组蛋白的表达**

## 3 讨 论

hMPV 于 2001 年首次被分离[1],序列和基因结构分析揭示该病毒为副粘病毒科偏肺病毒属中第一个人类病原(该属中原只有禽肺病毒),故将其命名为人类偏肺病毒。随即,世界各地相继报道该病毒区域流行证据,并证实 hMPV 在儿童呼吸道病原中占重要地位。我国首都儿科研究所亦于 2003 年

维普资讯 http://www.cqvip.com



采用 RT-PCR 方法在儿童气道标本中检测到 hMPV,证实其为我国儿童(尤其是婴幼儿)呼吸道感染的重要病毒病原之一[4]。从发病率来看,目前资料愈来愈提示,hMPV 为非流感病毒流行季节儿童呼吸道感染仅次于呼吸道合胞病毒的第二位病毒病原。因此,深入研究该病毒致病机制、研发单克隆抗体及疫苗对于防治 hMPV 感染具有重要的实践意义。

hMPV 为单股负链 RNA 病毒,基因组结构为 3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5',编码 9 个蛋白:核衣壳蛋白、核包膜磷酸化蛋白、非糖化基质蛋白、融合蛋白、M2-1 蛋白、M2-2 蛋白、小疏水表面蛋白、粘附蛋白和聚合酶亚单位。其中,融合蛋白即 F 糖蛋白是肺炎病毒亚科所有成员均具有的膜蛋白分子,表达于被感染细胞或病毒颗粒表面,是病毒粘附并感染靶细胞的主要功能分子。由于是膜蛋白成分,F 蛋白与机体的免疫系统接触最为频繁,因而在致病机制中扮演最为重要的角色。另一肺炎病毒亚科成员,呼吸道合胞病毒 (Respiratory syncytial virus,RSV),其 F 蛋白介导细胞与病毒包膜融合,使病毒的核酸成分进入靶细胞浆[5],完成病毒生活周期并促发机体的抗体反应和细胞毒性 T 细胞应答[6]。在动物模型上证实:F 蛋白诱导产生交叉反应性的、保护性抗体,防止不同抗原亚型的病毒感染。hMPV 与 RSV 有相似的基因结构和临床疾病表现,明确人群中或 hMPV 感染时 F 蛋白特异性抗体的水平、变化规律及其与疾病发生、发展的关系将为该病毒的免疫致病机制和机体的体液免疫保护机制提供十分有价值的线索。本研究所表达的 hMPV F 蛋白即可作为抗原,用于 F 蛋白特异性抗体检测,为 hMPV 感染的临床血清学诊断和发病机制研究奠定物质基础。

本研究表达蛋白所采用的 F 基因来自 A 亚型分离株 CAN97-83。hMPV F 蛋白核苷酸和氨基酸序列在 A、B 亚型中高度保守,且与其它副粘病毒科成员的 F 蛋白具有一定同源性[2]。肺病毒属中 RSV 和禽肺病毒(Avian pneumovirus,APV)的 F 蛋白首先合成前体蛋白 F0, F0 在 polybasic furin-like 切割位点被切割为 F1 和 F2。裂解后 F1 的 N 端暴露出融合肽,是真正介导病毒入胞和合胞病变形成的结构[7]。通过软件预测的未裂解的 F0 蛋白核心分子量为 58.5ku[8];Ishiguro[9]等报道昆虫细胞表达的 F 蛋白分子量约为 60ku。而 Tang 等[10]采用 b/hPIV3 表达 hMPV F 蛋白,以多克隆人或猪抗血清为一抗免疫沉淀法检测到大小为 80ku 的单一条带。Schickli[11]通过遗传法获得重组 hMPV,用抗 hMPV F 单克隆抗体为一抗免疫印迹法检测到两条带,分别为 F0 和 F1,分子量介于 83ku 和 39ku 间。Leung 等[12]疱疹性口角炎病毒(Vesicular stomatitis virus,VSV)做为载体,将 hMPV F 蛋白的全长基因插入 VSV 基因组,表达的 hMPV F 蛋白,同样有两条带,分别为 58ku 和 46ku。我们用昆虫细胞表达的重组 F 蛋白分子量约为 70ku 左右。上述重组 F 蛋白分子量差异可能由于表达载体不同、检测方法差异以及表达过程中目的蛋白的糖基化水平不同所致。杆状病毒表达系统具有优良的翻译后修饰功能,目标蛋白的抗原性改变甚微,可用于免疫学检测。本研究表达的 F 蛋白分子量介于既往研究报道的分子量之间,提示其糖基化水平较高。

综上,研究采用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统成功表达了 hMPV F 糖蛋白,对我国在进一步研究该病毒血清流行病学、致病机制等方面具有重要意义。

## 参 考 文 献


[1] ven den Hoogen BG,de Jong JC,Groen J,et al.A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease[J].Nat Med,2001;7(6):719-724.

[2] van den Hoogen BG,Bestebroer TM,Osterhaus AD,et al.Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus[J].Virology,2002;295(1):119-132.

[3] Luckow VA,Lee SC,Barry GF,et al.Efficient generation of infectious recombinant baculovirus by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in Escherichia coli[J].J Virol,1993;67(8):4566-4579.

[4] 朱汝南,钱 渊,邓 洁,等.北京地区六岁以下儿童急性呼吸道偏肺病毒感染[J].中华儿科杂志,2003;41(6):441-444.

[5] Walsh EE,Hruska J.Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins:identification of the fusion protein[J].J Virol,1983;47(1):171-177.

[6] Olmsted RA,Elango N,Prince GA,et al.Expression of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus by a recombinant vaccinia virus:comparison of the individual contributions of the F and G glycoproteins to host immunity[J].Proc Natl Acad Sci USA,1986;83(19):7462-7466.

[7] Morrison TG.Structure and function of a paramyxovirus fusion protein[J].Biochim Biophys Acta,2003;1614(1):73-84.

[8] Ishiguro N,Ebihara T,Endo R,et al.High genetic diversity of the attachment(G)protein of human metapneumovirus[J].J Clin Mi-


(下转第 502 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com



股蓝皂甙、银杏内酯黄酮作用 HL-60 细胞 72h 均能阻止 HL-60 细胞从 $G_0/G_1$ 期向 $G_2$/M+S 期移行，并能诱导部分 HL-60 细胞呈现 sub-$G_1$ 期的凋亡峰，从而抑制 HL-60 细胞增殖，并发生凋亡。

## 3 讨 论

绞股蓝皂甙广泛应用于临床，有明显的体内外抗肿瘤作用，其直接的细胞毒作用，可抑制肿瘤细胞生长增殖。竹本常松等发现 GPsX、Ⅲ以及其他在 $C_{20}$、$C_{21}$ 上有游离羟基的多种皂甙，对体外培养的肝癌细胞(MHC)、肺癌细胞(3LL)、子宫颈癌细胞(Hdas3)以及黑色素肿瘤细胞(B16)有抑制作用，随浓度增高抑制作用增强，同时对正常细胞增殖无不良影响。我国学者证明，绞股蓝皂甙对培养的小鼠 S180、艾氏腹水癌(EAC)、Hela 和 HLC 细胞均有直接杀灭作用[1]。银杏叶为银杏科银杏属植物的干燥叶，用作药物在我国已有五千年的历史。银杏内脂黄酮为银杏叶提取物，有效成分主要有二类，一类为黄酮甙类，另一类为银杏苦内脂。银杏叶提取物银杏内脂黄酮具有对机体抗癌细胞毒 T 细胞的增殖和杀伤肿瘤细胞功能功效的增强等作用[2-4]。

从表 1,2 可知：绞股蓝皂甙对 HL-60 细胞增殖的抑制作用随药物浓度的增加，抑制率增强（$P<0.05$）；随用药时间的延长其抑制率增加（$P<0.05$）。银杏内脂黄酮对 HL-60 细胞增殖的抑制作用也随药物浓度的增加，抑制率增强；随用药时间的延长而增加（$P<0.05$）。结果提示：给予高剂量的绞股蓝皂甙或银杏内脂黄酮并延长用药时间其作用尤为明显。这与国内外的研究结果相一致[5,6]。根据中效方程式可知：绞股蓝皂甙 $D_m$=0.1033mg/ml，而银杏内脂黄酮 $D_m$=0.1938mg/ml，表明绞股蓝皂甙对诱导肿瘤细胞 HL-60 增殖的抑制作用优于银杏内脂黄酮。

以流式细胞技术研究绞股蓝皂甙和银杏内脂黄酮对 HL-60 细胞增殖周期的影响，表明两药均可显著减少 $G_2$/M+S 的增殖分裂期细胞，而使更多细胞停滞在 $G_0/G_1$ 期，并能诱导 sub-$G_1$ 期（凋亡细胞）显著增加。提示绞股蓝皂甙和银杏内脂黄酮对 HL-60 细胞增殖的抑制作用与干扰其增殖和分裂，并诱导凋亡有关。有关上述作用的分子机制，值得进一步探讨。

## 参 考 文 献

[1] 潘 峰，刘 迪，黄翠霞，等.绞股蓝皂甙的药理与临床研究[J].现代中西医结合杂志，2006；15(5)：674-676.

[2] 张胜本，张连阳.肿瘤化学治疗敏感性与抗药性[M].成都：四川科学技术出版社，1995.108-112.

[3] 辛 华，商林珊，刘金成，等.绞股蓝皂甙抗谷氨酸诱导的氧化性神经毒性[J].山东大学学报：医学版，2004；42(6)：643-647.

[4] 刘军权，陈复兴，黄 键，等.银杏叶提取物增强细胞因子诱导的杀伤细胞杀伤肿瘤细胞活性的研究[J].陕西医学杂志，2002；31：469-471.

[5] DeFeudis FV，Papadopoulos V，Drieu K.Ginkgo biloba extracts and cancer：a research area in its infancy[J].Fundam Clin Pharmacol，2003；17(4)：405-417.

[6] 姜彬慧，杨万春，赵余庆.绞股蓝抗肿瘤作用研究现状[J].中药材，2003；26(9)：683-686.

(上接第 458 页)

crobiol，2004；42(8)：3406-3414.

[9] Ishiguro N，Ebihara T，Endo R，et al.Immunofluorescence assay for detection of human metapneumovirus-specific antibody by use of baculovirus-expressed fusion protein[J].Clin Diagn Lab Immunol，2005；12(1)：202-205.

[10] Tang RS，Schickli JH，MacPhail M，et al.Effects of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus antigen insertion in two 3'proximal genome positions of bovine/human parainfluenza virus type 3 on virus replication and immunogenicity[J].J Virol，2003；27(20)：10819-10828.

[11] Schickli JH，Kaur J，Ulbrandt N，et al.An S101P substitution in the putative cleavage motif of the human metapneumovirus fusion protein is a major determinant for trypsin-independent growth in vero cells and does not alter tissue tropism in hamsters[J].J Virol，2005；79(16)：10678-10689.

[12] Leung J，Esper F，Weibel C，et al.Seroepidemiology of human metapneumovirus(hMPV)on the basis of a movel enzyme-linked immunosorbent assay utilizing hMPV fusion protein expressed in recombinant vesicular stomatitis virus[J].J Clin Microbiol，2005；43(3)：1213-1219.