

GII 型诺如病毒 VP2 蛋白在昆虫细胞中的表达与定位研究

姚琳¹ 寇晓霞² 江艳华¹ 王联珠¹ 吴清平² 翟毓秀^{1*}

(1. 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所
山东 青岛 266071)

(2. 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物研究所 广东 广州 510070)

摘要:【目的】利用杆状病毒表达系统表达诺如病毒(GenegroupII) VP2 蛋白, 分析其亚细胞定位, 为深入研究 VP2 蛋白的功能奠定基础。【方法】设计可扩增完整 ORF3 基因片段的引物 P1 和 P2, 在下游引物中引入 6×His 标签的编码序列, 从质粒 pMD-ORF3 中克隆了含有 6×His 编码序列的 ORF3 基因, 与 pFastBac1 载体连接, 构建重组质粒 pFB-ORF3, 转化 DH10Bac 感受态细胞获得重组杆状病毒基因组 Bac-ORF3, 脂质体介导转染 sf9 昆虫细胞获得表达 VP2 蛋白的重组杆状病毒 Ac-VP2, 感染 sf9 细胞后, 收集病变细胞, 采用抗 6×His 标签的单克隆抗体作为一抗进行 Western blot 与间接免疫荧光实验鉴定。【结果】Western blot 实验证实 Ac-VP2 感染的 sf9 细胞在约 29 kD 处出现特异性条带; 间接免疫荧光实验证实 Ac-VP2 感染的 sf9 细胞出现特异性绿色荧光, 并且 VP2 主要定位于 sf9 的细胞核与细胞膜。【结论】诺如病毒 VP2 蛋白在 Ac-VP2 感染的 sf9 细胞中获得成功表达, 并且主要定位于 sf9 细胞的细胞核与细胞膜。

关键词: 诺如病毒, VP2 蛋白, 昆虫细胞, 表达, 亚细胞定位

Study on the expression of Norovirus (GenegroupII) VP2 protein in insect cells and its subcellular localization

YAO Lin¹ KOU Xiao-Xia² JIANG Yan-Hua¹ WANG Lian-Zhu¹

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31101883); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金计划项目(No. BS2010SW041); 中澳国际合作项目(No. 2010DFA31720); 中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(No. 2010-TS-10)。

*通讯作者: Tel/Fax: 86-532-85846230; 信箱: zhaiyx@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2011-09-05; 接受日期: 2011-11-15

WU Qing-Ping² ZHAI Yu-Xiu^{1*}

(1. Key Laboratory of Test and Evaluation on Quality and Safety of Aquatic Products, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China)

(2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

Abstract: [Objective] This study is to express Norovirus (GenegroupII) VP2 in insect cells, analysis the subcellular localization of VP2 and lay the foundation of the function study of VP2. **[Methods]** Norovirus (GenegroupII) ORF3 gene was amplified from plasmid pMD-ORF3 using primers P1/P2 (including 6×His tag coding sequence). The product was cloned into the vector pFastBac1 to construct recombinant plasmid pFB-ORF3. pFB-ORF3 was transformed into competent DH10Bac to get recombinant bacmid Bac-ORF3. Recombinant baculovirus, Ac-VP2, was generated for expressing VP2, by transfecting recombinant Bac-ORF3 with LipofactamineTM 2000 into sf9 insect cells. The expression product was testified by the western blot and indirect immunofluorescence assay with monoclonal antibody against 6×His tag. **[Results]** The result of western blot showed a 29 kD specific bind in sf9 cells infected by Ac-VP2. Indirect immunofluorescence assay showed the specific green fluorescence in sf9 cells infected by Ac-VP2, and the green fluorescence could localize at nuclear and membrane of sf9 cells. **[Conclusion]** These results demonstrated that the Norovirus (Genegroup II) VP2 was expressed in sf9 cells successfully and could localize at nuclear and membrane of sf9 cells.

Keywords: Norovirus, VP2 protein, Insect cell, Expression, Subcellular localization

诺如病毒(Norovirus)属于杯状病毒科, 诺如病毒属^[1], 是 1972 年在美国发现的一种病毒^[2], 分为 5 个基因组(Genegroup): GI、GII、GIII、GIV、GV。近年来的研究表明该病毒是非菌性急性胃肠炎的主要病原之一^[3-4], 1995 年由方肇寅等学者证实国内婴幼儿存在诺如病毒的感染^[5]。诺如病毒基因组为单股正链 RNA, 大小约为 7.5-7.7 kb, 基因组共包含 3 个开放阅读框(ORF), ORF1 编码一个约 200 kD 的蛋白前体, 在病毒蛋白酶的作用下裂解成数个病毒复制所需要的非结构蛋白, 如解旋酶、依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶等^[6-7]; ORF2 编码主要的结构蛋白 VP1, 通过杆状病毒表达系统表达的 VP1 能够形成病毒样颗粒(Virus-like particles, VLPs)^[8], 并且其形态结构、抗原性、免疫原性都十分接近于天然病毒粒子^[7,9-11]; ORF3 编码 VP2 蛋白, 虽然在病毒粒子中检测到了 VP2

的存在^[12], 但有研究认为 VP2 蛋白并不是形成病毒样颗粒所必需的^[8,14-15]。由于目前诺如病毒缺乏成熟的细胞培养系统和小动物模型, 对 VP2 蛋白的研究相对较少。本研究利用杆状病毒表达系统表达了诺如病毒 VP2 蛋白, 分析了其亚细胞定位形式, 为进一步研究 VP2 蛋白的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞

含有诺如病毒(GII 型) ORF3 基因的质粒 pMD-ORF3 由上海交通大学王大鹏博士构建并提供(GenBank 登录号 EF635440); 载体 pFastBac1、DH10Bac 菌株为 Invitrogen 公司产品; sf9 昆虫细胞由中国科学院武汉病毒研究所孙修炼研究员惠赠; 大肠杆菌 DH5α 感受态细胞由本

研究室保存。

1.2 工具酶与主要试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自 Fermentas 公司, DNA 快速回收试剂盒购自上海生工生物工程公司, 抗 6×His 标签单克隆抗体购自 TIANGEN 公司, FITC 标记的驴抗鼠 IgG 购自广州合达公司, 昆虫细胞培养基、胎牛血清、转染试剂 Lipofactamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司。

1.3 引物设计与 PCR 扩增

根据诺如病毒 ORF3 基因的序列, 设计可扩增完整 ORF3 基因片段的引物 P1/P2, 上下游引物两端分别设计 *Sal* I 和 *Kpn* I 酶切位点(下划线部分), 为了便于重组蛋白的鉴定, 在下游引物中引入了 6×His 标签的编码序列(斜体部分), 引物序列如下:

P1: 5'-TTTGTCGACATGGCTGGGGCTTTC TTTGC-3';

P2: 5'-TTTGGTACCTTAGTGATGGTGATG GTGATGCGCCCGTGACTCC-3'。

ORF3 的扩增以质粒 pMD-ORF3 为模板, 反应条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。通过 1.0 % 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

1.4 重组转座质粒的构建与鉴定

将上述扩增产物经过 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化后, 用 *Sal* I 和 *Kpn* I 双酶切, 再次回收, 插入同样用 *Sal* I 和 *Kpn* I 双酶切的 pFastBac1 载体中, 将连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落少量提取质粒并酶切鉴定, 将阳性克隆送至上海生工生物公司进行测序。

1.5 重组 Bacmid 的提取与 PCR 鉴定

将重组转座质粒转化 DH10Bac 感受态细胞, 涂布于含有 X-gal 和 IPTG 的抗性平板(含庆大霉素、卡那霉素及四环素), 挑取 8-10 个白色单菌

落, 再次在含有 X-gal 和 IPTG 的抗性平板上划线培养, 72 h 后挑取白色单菌落, 提取重组 Bacmid 进行 PCR 鉴定。所用引物为 M13F/M13R, PCR 反应按照 Invitrogen 公司的 Bac-to-Bac 表达系统操作手册提供的参数进行。

1.6 重组杆状病毒的获得、扩增与 ORF3 基因的表达

取 1 μ g 重组 Bacmid, 按照 Bac-to-Bac 表达系统操作手册提供的方法转染 sf9 昆虫细胞, 27 °C 培养, 待细胞出现病变后, 收取上清, 存于 4 °C 冰箱。重组病毒的滴度按照操作手册提供的方法测定。取 0.1 MOI 的重组病毒, 接种于 sf9 单层细胞, 27 °C 培养, 待细胞出现 80% 病变后, 收集上清, 分装于灭菌离心管中, 保存于 -80 °C 冰箱。

蛋白表达检测时, 取 5 MOI 重组病毒, 接种于 sf9 单层细胞, 27 °C 培养, 分别于 24、48、72、96、120、144、168 h 收集细胞进行蛋白表达检测。

1.7 表达产物的鉴定

1.7.1 表达产物的 Western blot 分析: 用超声波处理不同时间收集的病变细胞, 加入 1/4 体积的 5×上样缓冲液, 沸水浴 10 min 后置于冰上, 取适量样品于 12 % 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳, 同时设杆状病毒野毒感染的 sf9 细胞与正常 sf9 细胞作对照, 电转印至硝酸纤维素膜, 用含 10% 脱脂奶粉的 TBST 封闭过夜后, TBST 洗涤 3 次, 与抗 6×His 标签单克隆抗体(用 TBST 作 1: 200 倍稀释)作用 1 h, TBST 洗涤 3 次, 与辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (用 TBST 作 1: 5 000 倍稀释)作用 40 min 后, TBST 洗涤 5 次, DAB 显色观察。

1.7.2 表达产物的间接免疫荧光分析: 将重组病毒感染 96 h 后的 sf9 细胞, 用 PBS (pH 7.2)洗涤 3 次, 甲醇固定 15 min, 用含 10 % 牛血清白蛋白的 PBS 封闭 30 min, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 与抗 6×His 标签单克隆抗体(用 PBS 作 1: 500 倍稀释)

37 °C 作用 1 h, PBS 洗涤 3 次后与 FITC 标记的驴抗鼠 IgG (用 PBS 作 1: 200 倍稀释)作用 40 min, 再经 PBS 洗涤 5 次后直接置于倒置荧光显微镜 (LEICA DMI3000)下观察荧光。同时设杆状病毒野毒感染的 sf9 细胞与正常 sf9 细胞作对照。

2 结果

2.1 重组转座质粒的构建

PCR 扩增诺如病毒 ORF3 基因, 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后可见 0.8 kb 左右大小的特异性条带, 与预计 DNA 片段大小相符(图 1)。进一步将纯化的 PCR 产物用 *Sal* I 和 *Kpn* I 双酶切, 插入同样用 *Sal* I 和 *Kpn* I 双酶切的 pFastBac1 转座载体中, 获得重组质粒 pFB-ORF3, 酶切鉴定证实构建正确。序列测定证实 PCR 过程中没有碱基误配。

2.2 重组 Bacmid 的筛选与鉴定

将重组质粒 pFB-ORF3 转化 DH10Bac 感受态细胞后, 在含有庆大霉素、卡那霉素、四环素、IPTG 和 X-gal 平板上进行蓝白斑筛选, 48 h 后挑

选白色菌落再次划线培养, 挑取白色单菌落, 提取重组 Bacmid DNA 用 PCR 法鉴定, 电泳可见未重组的 Bacmid PCR 产物大小约为 300 bp, 含 ORF3 基因的重组 Bacmid 的 PCR 产物大小为 3 107 bp (2 300 bp+807 bp) (图 2), 与预期大小片段一致, 说明 ORF3 基因已成功重组到杆状病毒基因组中, 命名为 Bac-ORF3。

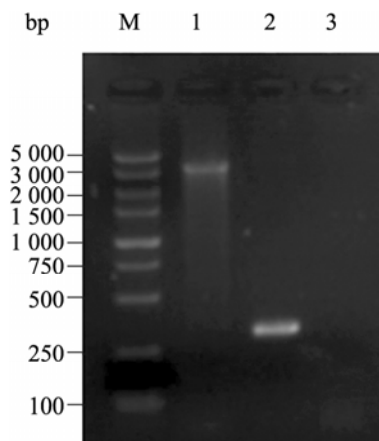


图 2 重组 Bac-ORF3 的 PCR 鉴定

Fig. 2 Analyzing recombinant bacmid DNA by PCR
Note: M: DNA marker; 1: Bac-ORF3; 2: Bacmid alone; 3: Negative control.

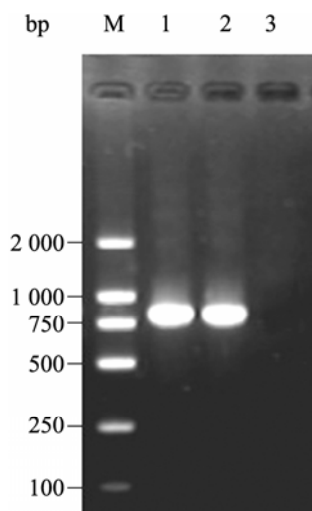


图 1 ORF3 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of ORF3 gene

Note: M: DNA marker; 1,2: PCR of ORF3 gene; 3: Negative control.

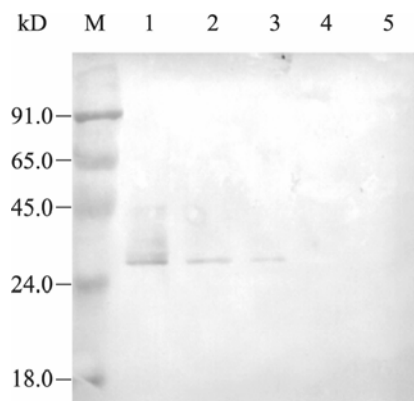


图 3 诺如病毒 VP2 蛋白的 Western blot 鉴定结果

Fig. 3 Western blot analysis of the sf9 infected with Ac-VP2

Note: M: Protein marker; 1–3: sf9 harvested at 72 h、96 h、120 h post infection respectively; 4: sf9 infected with WT; 5: sf9 uninfected.

2.3 重组病毒的获得和扩增

在脂质体的介导下,用 Bac-ORF3 转染 sf9 细胞,约 72 h 后可观察到细胞变圆,直径变大,停止分裂,折光率增强,直到细胞裂解等细胞病变现象,正常细胞则无上述变化,将该重组病毒命名为 Ac-VP2。取病变细胞培养基上清,接种于正常单层 sf9 细胞,进行病毒的扩增。

2.4 VP2 的检测与鉴定

2.4.1 VP2 的 Western blot 鉴定: 分别收集 Ac-VP2 感染 48、72、96、120、144 和 168 h 后的病变细胞,经 SDS-PAGE 与 Western blot 分析证实,在约 29 kD 处出现特异性条带,与预期的大小相当,而野毒感染的细胞与正常细胞对照组则无此特异性条带(图 3)。

2.4.2 VP2 的间接免疫荧光检测: 将重组病毒

Ac-VP2 感染 72 h 的 sf9 细胞进行间接免疫荧光试验,结果发现,在 Ac-VP2 感染的细胞中,绿色荧光主要分布于细胞核与细胞膜,而在野毒感染的细胞和正常细胞中没有发现特异性绿色荧光(图 4)。

3 讨论

由于缺乏细胞培养系统与小动物模型,诺如病毒的研究一度受到制约,分子生物学与基因工程的发展,为诺如病毒的研究提供了新的研究方法。目前已经确定诺如病毒 ORF1 编码主要衣壳蛋白 VP1,通过杆状病毒表达系统表达的 VP1 可以自动组装成 VLPs,进一步的研究发现了 VP1 蛋白对于组装 VLPs 所必需的氨基酸残基,VP1 的受体研究也成为研究的热点并不断深入;而我国近年诺如病毒的研究主要集中于富集检测

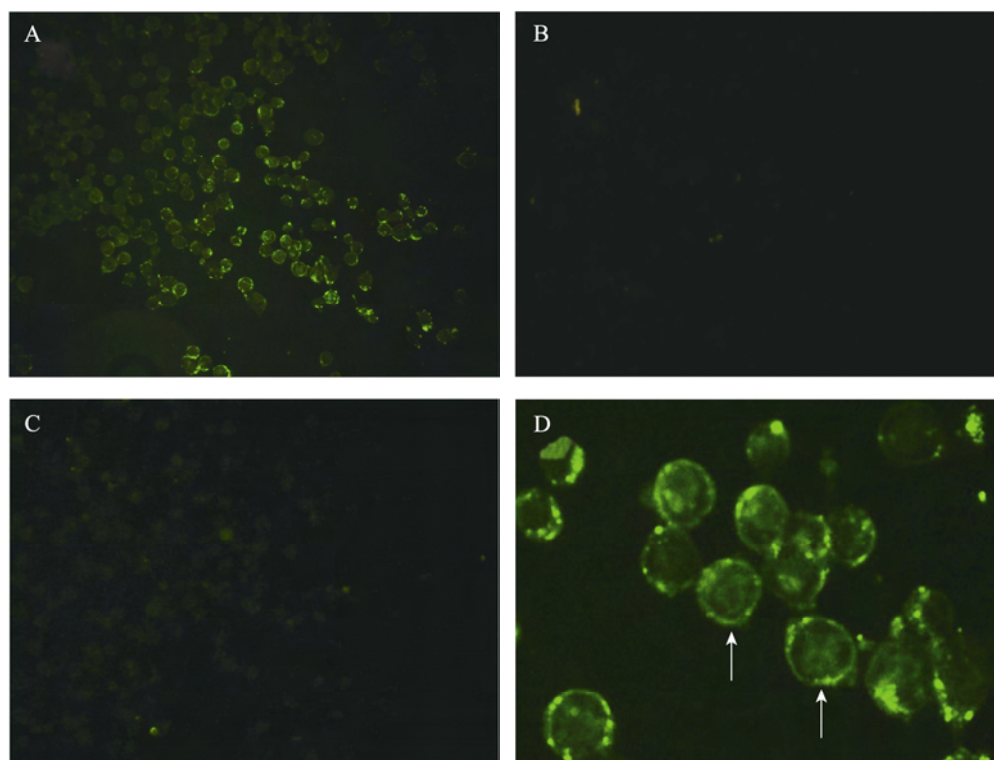


图 4 NoV VP2 在 sf9 细胞中表达的 IFA 鉴定

Fig. 4 Identification of expression of NoV VP2 on sf9 cells by IFA

Note: A: sf9 infected with Ac-VP2 (20 \times); B: sf9 infected with WT; C: sf9 uninfected; D: sf9 infected with Ac-VP2 (40 \times).

方法^[16]、VP1 蛋白与受体结合方式^[17-18]等领域的研究,取得了令人瞩目的进展。与此形成对照的是,VP2 蛋白的研究却远不如 VP1 深入。目前 VP2 蛋白的功能并不明确,有许多研究者发现,VP1 在没有 VP2 的情况下可以自动组装成 VLPs,说明 VP2 蛋白并不是 VLPs 形成所必需的;但也有研究证实 VP2 作为一个较小结构蛋白(Minor structure protein)参与了 VLPs 的组装^[12],VP2 的存在能以一种顺式正调控的方式提高 VP1 的表达量,并且可以维持 VLPs 大小的均一性^[19],这给研究人员提供了一个很大的研究空间,以进一步探索诺如病毒 VP2 的功能。

本实验通过杆状病毒表达系统,成功表达了诺如病毒 VP2 蛋白。由于缺乏 VP2 蛋白的抗体,给蛋白表达的鉴定带来一定困难。本研究在诺如病毒 ORF3 的 PCR 扩增下游引物序列中引入 6 个组氨酸标签的编码序列作为标记物,使得 VP2 蛋白与 6 个组氨酸进行融合表达,可以利用商品化的抗 6×His tag 抗体对重组 VP2 蛋白进行 Western blot 鉴定。只有 6 个组氨酸大小的标签很小,可以放在 C 端或者 N 端,不会影响目的蛋白分子量,经多种融合蛋白验证对蛋白的分泌、折叠、结构甚至功能均没有影响。

通过 Western blot 分析,本研究发现 VP2 的分子量大小约为 29 kD,虽然与软件预测的结果一致,但与国外的研究结果有些不同, Glass 的结果表明,VP2 的大小为 23 kD^[12],这可能是由于 VP2 是来源于诺如病毒的原型株 Norwalk 病毒的缘故。Norwalk 病毒的 VP2 蛋白含有 212 个氨基酸残基,而本研究表达的 GII 型诺如病毒 VP2 蛋白含有 268 个氨基酸残基,两者氨基酸数量的差异是导致表达蛋白大小存在差异的主要原因。

生物信息学分析表明,VP2 属于碱性蛋白,等电点大于 10,这种特性提示 VP2 极有可能与核酸结合,而细胞中核酸含量最丰富的亚细胞结构

就是细胞核,也就是说 VP2 可能定位于细胞核。本研究进行 VP2 蛋白的间接免疫荧光试验时,在 40× 荧光显微镜下发现绿色荧光集中在昆虫细胞的细胞核内,这表明 NoV VP2 蛋白可以定位于细胞核,该结果符合生物信息学的预测。Glass 也进行过诺如病毒 VP2 的间接免疫荧光实验,其结论是 VP2 定位于细胞浆^[12],与本实验的结果不一致,我们初步推测有如下两种可能: Glass 发表图片的放大倍数与本实验的 20× 放大倍数(图 4A)接近,由于昆虫细胞 sf9 在被杆状病毒感染之后,会出现细胞核增大的细胞病变效应,有时甚至变大的细胞核会“充满”整个细胞,所以在 20× 荧光显微镜下观察 VP2 的定位形式时,是否存在将增大的细胞核误认为是整个细胞从而做出“VP2 蛋白定位于 sf9 细胞浆”的判断? 第二种可能是 Glass 研究的是 Norwalk 病毒的 VP2,与本实验研究的 VP2 在氨基酸序列方面有一定的区别,是不是这种氨基酸序列与数量上的区别造成了其亚细胞定位形式的变化,还需要进一步深入研究。

定位于细胞核的蛋白一般具有核定位信号(Nuclear localization signal, NLS), NLS 是另一种形式的信号肽,可位于多肽序列的任何部分,通常含有 4-8 个氨基酸,并且没有专一性,其作用是帮助亲核蛋白进入细胞核从而发挥相应功能。目前认为有多种类型的核定位信号,这些信号都具有一个带正电荷的肽核心。第一个被确定的 NLS 序列的蛋白质是猿猴病毒 40 (SV40)的 T 抗原,它在细胞质中合成后很快积累在细胞核中,是病毒 DNA 在核内复制所必需的蛋白质。其野生型的氨基酸序列为 Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val,即使单个氨基酸突变所产生的突变型 NLS (Pro-Lys-Tyr-Lys-Arg-Lys-Val)也能阻止这种蛋白质进入细胞核而停留在细胞质中。经典的“核心”NLS (“Core”NLS)中间的 6 肽包含 4 个或 4 个以上精氨酸和赖氨酸,两端是酸性氨基酸或脯氨

酸或甘氨酸,通过序列分析,并没有发现诺如病毒 VP2 存在经典的核定位序列。有研究表明,牛疱疹病毒 VP22 蛋白虽然没有 NLS,但可以进入细胞核,所以有学者推测某些蛋白质的核定位序列是不连续的,是一种依赖于构象的非经典的核定位序列^[20]。目前发现有多种来源于细胞或者病毒的蛋白具有这种特性^[21-23]。诺如病毒 VP2 蛋白是否也存在这种非连续的、依赖于构象的非经典核定位序列,还需进一步深入研究加以证实。

本文通过 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统表达了诺如病毒(GengroupII) VP2 蛋白,分析了诺如病毒(GengroupII) VP2 蛋白的细胞定位形式,为今后深入研究诺如病毒 VP2 蛋白的功能奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Green KY, Ando T, Balayan MS, et al. Taxonomy of the caliciviruses[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2000, 181(S2): 322-330.
- [2] Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis[J]. *Journal of Virology*, 1972, 10(5): 1075-1081.
- [3] Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, et al. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2002, 186(1): 1-7.
- [4] Lopman BA, Reacher MH, Van Duynhoven Y, et al. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2003, 9(1): 90-96.
- [5] 方肇寅, 温乐英, 晋圣瑾, 等. 在我国腹泻患儿中发现诺瓦克样病毒感染[J]. *病毒学报*, 1995, 11(3): 215-219.
- [6] Jiang X, Wang M, Wang KN, et al. Sequence and genomic organization of Norwalk virus[J]. *Virology*, 1993, 195(1): 51-61.
- [7] Prasad BVV, Hardy ME, Dokland T, et al. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid[J]. *Science*, 1999, 286(5438): 287-290.
- [8] Jiang X, Wang M, Graham DY, et al. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein[J]. *Journal of Virology*, 1992, 66(11): 6527-6532.
- [9] Xi JN, Graham DY, Wang KN, et al. Norwalk virus genome cloning and characterization[J]. *Science*, 1990, 250(4987): 1580-1583.
- [10] Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, et al. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus[J]. *Science*, 1993, 259(5094): 516-519.
- [11] Seah EL, Marshall JA, Wright PJ. Open reading frame 1 of the Norwalk-like virus Camberwell: completion of sequence and expression in mammalian cells[J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(12): 10531-10535.
- [12] Glass PJ, White LJ, Ball JM, et al. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein[J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(14): 6581-6591.
- [13] Green KY, Lew JF, Jiang X, et al. Comparison of the reactivities of baculovirus-expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with those of the native Norwalk virus antigen in serologic assays and some epidemiologic observations[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 31(8): 2185-2191.
- [14] Jiang X, Matson DO, Ruiz-Palacios GM, et al. Expression, self-assembly, and antigenicity of a Snow Mountain agent-like calicivirus capsid protein[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33(6): 1452-1455.
- [15] Jiang X, Zhong WM, Kaplan M, et al. Expression and characterization of Sapporo-like human calicivirus capsid proteins in baculovirus[J]. *Journal of Virological Methods*, 1999, 78(1/2): 81-91.
- [16] 张绪富, 戴迎春, 宋灿磊, 等. 诺如病毒病毒样颗粒的表达及其与 HBGAs 受体的结合研究[J]. *重庆医科大学学报*, 1995, 36(3): 315-318.
- [17] 靳森, 何雅青, 李慧莹, 等. 我国诺如病毒 SZ9711

- 株 P 粒子制备及唾液 HBGA 受体亲和性分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2010, 24(1): 5-7.
- [18] 梁莎, 谢广成, 徐子乾, 等. 环境水体中 GII 型诺如病毒浓缩研究[J]. 病毒学报, 2011, 27(1): 58-63.
- [19] Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, et al. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein[J]. Journal of Virology, 2003, 77(21): 11603-11615.
- [20] Zhu J, Qiu ZH, Wiese C, et al. Nuclear and mitochondrial localization signals overlap within bovine herpesvirus 1 tegument protein VP22[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(16): 16038-16044.
- [21] Kretsovali A, Spilianakis C, Dimakopoulos A, et al. Self-association of class II transactivator correlates with its intracellular localization and transactivation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(34): 32191-32197.
- [22] Lischka P, Sorg G, Kann M, et al. A nonconventional nuclear localization signal within the UL84 protein of human cytomegalovirus mediates nuclear import via the importin α/β pathway[J]. Journal of Virology, 2003, 77(6): 3734-3748.
- [23] Antoine M, Reimers K, Wirz W, et al. Identification of an unconventional nuclear localization signal in human ribosomal protein S2[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 335(1): 146-153.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。