

用反向遗传 8 质粒系统构建流感 H1 N1 重组病毒

颜 艳^{1,2}, 杨鹏辉², 罗德炎², 崔 萍¹, 王希良², 何维明¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨陵 712100; 2 军事医学科学院 微生物流行病学研究所, 北京 100071)

[摘 要] 为了建立用于流感病毒拯救的反向遗传操作系统, 用 RT-PCR 方法扩增得到 A 型流感病毒流行株 A/shanghai/7/99 的 HA 和 NA 基因, 将其克隆到 pGEM-T 载体上并测序, 挑选阳性克隆分别用 BsmB I、Bsa I 酶切, 连接到以 BsmB I 酶切的双向转录/表达载体 pAD3000 上, 获得重组质粒 pAD-HA 和 pAD-NA, 分别与含 A/PR/8/34 流感病毒 7 个基因的阳性质粒共转染 COS-1 细胞, 拯救了重组病毒 R-HA-PR8 和 R-NA-PR8, 说明构建的重组质粒 pAD-HA 和 pAD-NA 是正确的, 将 pAD-HA 和 pAD-NA 与含 A/PR/8/34 流感病毒 6 个基因的阳性质粒共转染 COS-1 细胞, 培养 48 h 后吸取上清液及 COS-1 细胞, 接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 孵育 96 h 后, 收获鸡胚尿囊液进行血凝和血凝抑制试验。结果显示, 鸡胚尿囊液中重组病毒 H1N1 的血凝效价和血凝抑制效价均为 2^9 , 鸡胚半数感染剂量为 $10^{-8.5} \sim 10^{-9}$ 。病毒的成功拯救为进一步深入研究流感病毒的基因功能以及流感新型疫苗的研发奠定了基础。

[关键词] 流感病毒; 反向遗传学; 8 质粒系统; 重组病毒

[中图分类号] Q78

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)09-0015-04

Construction of reassortant H1N1 influenza A virus by eight-plasmid system

YAN Yan^{1,2}, YANG Peng-hui², LUO De-yan², CUI Ping¹,
WANG Xi-liang², HE Wei-ming¹

(1 College of Animal Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

Abstract: To establish the reverse genetic system for influenza virus, Hemagglutinin (HA) and Neuraminidase (NA) gene of A/shanghai/7/99 subtype H1N1 were amplified by RT-PCR, then were cloned into the vector pGEM-T and sequenced. The positive clone was digested by BsmB I and Bsa I, separately, then inserted into the bi-directional expression vector pAD3000 to construct recombinant plasmids: pAD-HA and pAD-NA. They were transfected into COS-1 cells in combination with plasmids incorporating the other 7 genes of A/PR/8/34 respectively to generate reassortant virus R-HA-PR8 and R-NA-PR8, which showed that recombinant plasmids: pAD-HA and pAD-NA had been correctly constructed. pAD-HA and pAD-NA were transfected into COS-1 cells in combination with plasmids incorporating the inner genes of A/PR/8/34 for 48 hours after transfection, then the supernatant and COS-1 cells transfected were inoculated into the allantoic cavity of 10-day-old specific-pathogen-free (SPF) chicken eggs. The HA and HI titer were determined, The HA titer is 2^9 and EID_{50} is between $10^{-8.5} - 10^{-9}$. The result provided the basis for further research on gene function and novel vaccine candidate of human influenza virus.

Key words: influenza virus; reverse genetics; eight-plasmid system; reassorted virus

[收稿日期] 2006-08-17

[作者简介] 颜 艳(1982-), 女, 四川三台人, 在读硕士, 主要从事基因工程疫苗研究。E-mail: yanjoys@126.com

[通讯作者] 何维明(1944-), 男, 陕西临潼人, 教授, 硕士生导师, 主要从事动物疫病防控研究。

流感(Influenza)是由流行性感病毒(Influenza Virus)感染引起的急性呼吸道传染病。流感病毒属于正粘病毒科流感病毒属,基因组是负义单股 RNA,分为 8 个片段,由大到小依次命名为 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M 和 NS。根据该病毒核蛋白(Nucleoprotein, NP)和基质蛋白(Matrix protein, M)抗原性的不同,可将流感病毒分为 A、B 和 C 3 型。A 型流感病毒对人类威胁最大,曾引起人类历史上 4 次流感大流行,除感染人外,还可引起禽、猪、马等多种动物感染^[1-4]。根据表面抗原血凝素(Hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)的抗原性不同,可将 A 型流感病毒分成若干亚型,目前已发现了 16 种 HA 亚型和 9 种 NA 亚型。A 型流感病毒的抗原性易发生变异,抗原的漂移和转换给流感的防治带来了困难。目前,接种疫苗仍然是预防和控制流感的主要手段。流感病毒的不断变异使人类需要对其进行严密的监测,并筛选出具有引发流行潜力的毒株作为疫苗制备的候选株,快速生产疫苗,使人类能对流感作出有效的应对。

RNA 病毒的反向遗传操作技术(或称病毒拯救),指使用以质粒为基础的操作系统克隆 cDNA 产生病毒的过程^[5],其在病毒的生活周期、致病机制、新型疫苗构建和表达外源基因等方面的研究中显示了良好的应用前景。1999 年以后,Neumann 等^[6]以及 Hoffmann 等^[7]报道了完全以质粒为基础的反向遗传操作系统;Hoffmann 等^[7]建立的 8 质粒拯救系统,其载体的启动子和终止序列为 pol I_{pol} I 系统,以数量最少的质粒转染细胞,利用同一载体在细胞内实现病毒 RNA 和蛋白合成,进而将其包装成病毒^[7-8]。由此可知,以质粒为基础的反向遗传技术,为流感病毒疫苗候选株的快速筛选提供了可能。

本研究采用以 8 质粒拯救系统为基础的反向遗传操作技术,对 A/PR/8/34 流感病毒与 A 型流感病毒流行株 A/shanghai/7/99 基因重组病毒 H1N1 的构建方法进行了探索,以期 A 型人流感病毒新型疫苗的开发研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株、细胞、鸡胚和血清 A 型流感病毒流行株 A/shanghai/7/99 由中国疾病预防控制中心(CDC)提供;SPF 鸡胚,购自北京实验动物中心;COS-1、MDCK 细胞系和菌种 DH5a 等,由军事医学科学院微生物流行病研究所病原微生物生物安全国家重点

实验室保存;H1 亚型阳性血清,由国家禽流感参考实验室提供。

1.1.2 主要试剂 RNA 抽提试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;AMV 反转录酶、T4 DNA 连接酶和 pGEM-T 载体试剂盒均购自 Promega 公司;Expand High Fidelity PCR System、dNTPs 和 Agarose Gel DNA Extraction Kit 均为 Roche 产品;BsmB I 和 Bsa I 等限制性内切酶均购自 NEB 公司;转染试剂 Super Fect 和质粒抽提试剂盒(QIAprep Spin MiniPrep Kit)为 Qigen 公司产品。

1.1.3 8 质粒病毒拯救系统 由美国 Robert Webster 博士(St. Jude 儿童医院)惠赠。包括用于 cDNA 克隆的双向转录表达载体 pHW2000 及已克隆了 A/PR/8/34 8 个片段 cDNA 的 8 个质粒:pHW191-PB2、pHW192-PB1、pHW193-PA、pHW194-HA、pHW195-NP、pHW196-NA、pHW197-M、pHW198-NS。

1.1.4 引物的设计与合成 采用 Hoffmann 等^[9]报道的设计扩增 A 型流感病毒 HA 和 NA 全基因引物,引物序列如下:

Bm-HA-1: 5'-TATTCGTCTCAGGAGCAAAAGCAGGGG-3';

Bm-HA-2: 5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGT-3';

Ba-NA-1: 5'-TATTGGTCTCAGGAGCAAAAGCAGGAGT-3';

Ba-NA-2: 5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTT-3'。

引物序列中有 BsmB I 或 Bsa I 酶切位点,其由大连宝生物工程有限公司合成。

1.2 A 型流感病毒 A/shanghai/7/99 HA、NA 基因的 RT-PCR 扩增

1.2.1 A 型流感病毒 A/shanghai/7/99 RNA 的提取与反转录 采用 RNA 抽提试剂盒提取病毒 RNA,取基因组 RNA 35 μ L,加入 1 μ L 50 pmol/L unit12 通用引物,70 $^{\circ}$ C 变性 5 min,冰浴 5 min,加入 5 $\times$ RT Buffer 10 μ L,10 mmol/L dNTPs 2 μ L,反转录酶 AMV(10 U/ μ L) 1 μ L, RNasin(40 U/ μ L) 1 μ L,42 $^{\circ}$ C 冰浴 90 min 反转录,cDNA 置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.2.2 HA 和 NA 基因反转录产物的 PCR 扩增 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,具体反应体系如下:Expand High Fidelity 聚合酶 0.3 μ L,10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L,10 mmol/L dNTPs 1 μ L,上游引物

(50 pmol/L) 1 μ L, 下游引物(50 pmol/L) 1 μ L, cDNA 2 μ L, 加双蒸水补至 25 μ L; 按下列条件进行 PCR 扩增反应: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min 充分延伸。用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.3 A 型流感病毒 HA、NA 基因 T 载体的连接与鉴定

用胶回收试剂盒回收 1.2.2 中扩增的基因产物, 按照 pGEM-T 载体试剂盒说明书进行 A 型流感病毒 HA、NA 基因 T 载体的连接及蓝白斑筛选, 克隆的阳性质粒分别命名为 pGEM-T-HA 和 pGEM-T-NA, 对其分别进行 BsmB I 和 Bsa I 酶切鉴定, 并送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.4 双向转录表达质粒的构建

pGEM-T-HA 和 pGEM-T-NA 分别经 BsmB I、Bsa I 酶切后回收, 与经 BsmB I 酶切的双向转录表达载体 pAD3000 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 菌落 PCR 法筛选阳性克隆^[10], 并测序鉴定。阳性质粒分别命名为 pAD-HA 和 pAD-NA。

1.5 7+1 重组流感病毒的拯救

将含 A/PR/8/34 流感病毒 7 个基因 (NA 或 HA、PB1、PB2、PA、NP、M 和 NS) 的阳性质粒与含流感病毒流行株 A/shanghai/7/99 HA 基因 (或 NA 基因) 的质粒 pAD-HA (或 pAD-NA) 按质量比 1:1 的比例混合, 按照 Super Fect 转染试剂操作指南进行转染: 将 10 μ L Super Fect 转染试剂和 1.5 μ g 混合质粒用无抗生素无血清 DMEM 稀释至 100 μ L, 室温结合 5~10 min; 将 6 孔板中已培养 18~24 h、丰度 60%~90% 的 COS-1 细胞, 用无抗生素无血清的 DMEM 洗剂 2 次, 加入质粒和 Super Fect 的结合物, 均匀覆盖于 COS-1 细胞上, 在 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后吹落 COS-1 细胞, 将其与上清液一起收集。接种第 1 代 10 日龄 SPF 鸡胚, 96 h 后收集鸡胚尿囊液, 测定血凝抑制效价, 鉴定重组病毒, 获救病毒简称 R-HA-PR8 和 R-NA-PR8, 用 8 质粒系统中的 8 个质粒共转染作阳性对照。使用 pHW191-PB2、pHW192-PB1、pHW193-PA、pHW195-NP、pHW196-NA、pHW197-M、pHW198-NS 7 个质粒共转染作阴性对照。

1.6 流感 H1N1 重组病毒的拯救

将含 A/PR/8/34 流感病毒 6 个基因 (PB1、PB2、PA、NP、M、NS) 的阳性质粒与含 A/shanghai/7/99 HA 和 NA 基因质粒 pAD-HA、pAD-NA 按质量比 1:1 的比例混合共转染 COS-1 细胞, 拯救

流感病毒, 获救病毒简称 H1N1 重组病毒, 具体方法同 1.5。使用 pHW191-PB2、pHW192-PB1、pHW193-PA、pHW195-NP、pHW196-NA、pHW197-M、pHW198-NS 7 个质粒共转染作阴性对照。

1.7 获救流感病毒的鉴定

1.7.1 病毒的血凝和血凝抑制试验 获救病毒 R-HA-PR8、R-NA-PR8 和 H1N1 的第一代鸡胚尿囊液血凝和血凝抑制试验按参考文献^[11]的方法进行。

1.7.2 获救流感 H1N1 重组病毒的 RT-PCR 及测序鉴定 将 H1N1 病毒在鸡胚中传至 4 代, 收集尿囊液用 RT-PCR 方法 (同 1.2) 扩增获救病毒 H1N1 中的 HA 和 NA 基因, 扩增产物送联合基因上海联众基因研究院测序鉴定。

1.7.3 获救病毒 H1N1 鸡胚半数感染剂量 (EID₅₀) 的测定 将含获救病毒 H1N1 的第 4 代鸡胚尿囊液进行 10 倍递进稀释, 接种于 10 日龄 SPF 鸡胚, 接种量为 0.2 mL/胚, 每个稀释梯度接种 4 个鸡胚, 35 $^{\circ}$ C 培养, 取出 24 h 后的死胚和培养至 96 h 的胚, 血凝效价在 1:16 以上的判定为鸡胚感染阳性, Reed-Muench 法计算 EID₅₀^[11]。

2 结果与分析

2.1 A 型流感病毒 A/shanghai/7/99 HA 和 NA 基因的 RT-PCR 扩增结果

以提取的 A 型流感病毒 A/shanghai/7/99 RNA 为模板进行 HA 和 NA 基因 RT-PCR 扩增, 经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳得到大小约为 1 700 bp 和 1 400 bp 的 DNA 条带 (图 1), 扩增片段大小与预期结果一致。

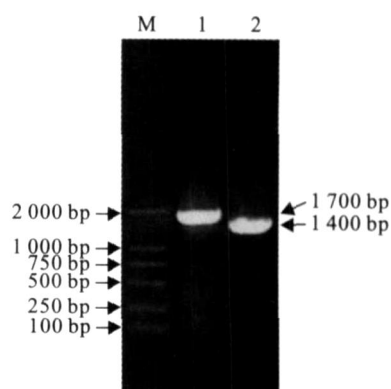


图 1 A 型流感病毒 A/shanghai/7/99 株 HA、NA 基因的 RT-PCR 扩增结果

M. DNA 标准分子量 2000; 1. HA 扩增产物; 2. NA 扩增产物

Fig. 1 RT-PCR Products of HA and NA

M. DL2000 Marker; 1. PCR Product of HA; 2. PCR Product of NA

2.2 重组质粒 p GEM- T- HA 和 p GEM- T-NA 的酶切鉴定结果

提取阳性重组质粒 p GEM- T- HA 和 p GEM- T- NA 分别用 *BsmB* I 和 *Bsa* I 酶切,产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测可知, p GEM- T- HA 酶切后得到 3 000 bp 的载体片断和 1 700 bp 的目的片断; p GEM- T- NA 酶切后得到 3 000 bp 的载体片断和 1 400 bp 的目的片段,与预期结果一致(图 2)。

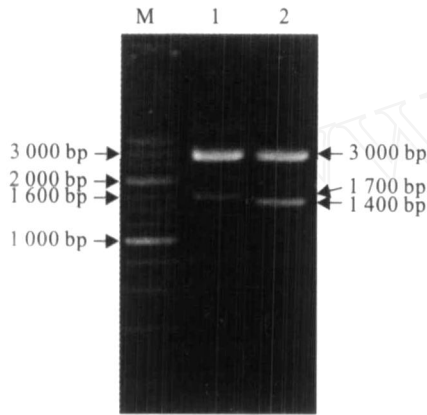


图 2 重组质粒 p GEM- T- HA 和 p GEM- T- NA 的酶切鉴定结果

M. DNA 标准分子量 2000;1~2. p GEM- T- HA 和 p GEM- T- NA 的 *BsmB* I、*Bsa* I 酶切产物

Fig. 2 Restriction analysis of recombinant plasmid
M. DL2000 Marker;1. *BsmB* I digestion;2. *Bsa* I digestion

2.3 7 + 1 重组流感病毒的拯救

含 A/ PR/ 8/ 34 株流感病毒 7 个基因的质粒与含 *HA* 或 *NA* 基因的质粒共转染 COS-1 细胞,收集上清液及 COS1-细胞,接种第 1 代 10 日龄 SPF 鸡胚,96 h 后收集尿囊液,测定血凝效价达 $2^8 \sim 2^{10}$ 。用 H1 亚型阳性血清进行 R- HA- PR8、R- NA- PR8 的血凝抑制试验,结果表明,病毒 R- HA- PR8 和 R- NA- PR8 可被 H1 亚型阳性血清抑制,血凝抑制效价均为 2^9 。阴性对照转染孔的上清液和 COS-1 细胞接种鸡胚,连续传 2 代,鸡胚尿囊液中未检测到血凝效价。

2.4 流感 H1N1 重组病毒的拯救

含 A/ PR/ 8/ 34 株流感病毒 6 个基因的质粒与含 *HA* 和 *NA* 基因的质粒共转染 COS-1 细胞,接种第 1 代 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊液,血凝效价达 2^9 。用 H1 亚型阳性血清进行 H1N1 的血凝抑制试验,结果表明,病毒 H1N1 可被 H1 阳性血清抑制,血凝抑制效价为 2^9 。阴性对照转染孔的上清液和 COS-1 细胞接种鸡胚,连续传 2 代,鸡胚尿囊液中

未检测到血凝效价。

2.5 获救 H1N1 流感病毒的 RT-PCR 及测序鉴定

RT-PCR 方法扩增获救病毒 H1N1 的 *HA* 和 *NA* 基因,经联合基因上海联众基因研究院测序鉴定,结果表明,获救病毒 H1N1 的 *HA*、*NA* 基因与 A 型流感病毒流行株 A/ shanghai/ 7/ 99 完全一致。

2.6 获救病毒 H1N1 鸡胚半数感染剂量(EID₅₀)的测定

Reed-Muench 法测得获救病毒 H1N1 鸡胚半数感染剂量(EID₅₀)为 $10^{-8.5} \sim 10^{-9}$ 。

3 讨 论

病毒拯救或病毒的感染性分子克隆是当前发展较快的一项技术,已广泛应用于多种病毒的拯救^[11-15]。流感病毒是分节段负链 RNA 病毒,其基因组不仅在细胞核内复制,而且还要同时在细胞内形成 8 个功能性核糖核蛋白复合物(RNPs),从而使流感病毒拯救建立的难度增大。本试验运用 Hoffmann 等^[8]建立的 8 质粒系统进行流感病毒的拯救,首先克隆了流感病毒 A/ shanghai/ 7/ 99 流行株的基因 *HA* 和 *NA*,测序验证,已将其克隆至双向转录表达载体 pAD3000 上,为验证含有基因 *HA* 和 *NA* 的重组质粒能否有效工作,将其与互补的含 A/ PR/ 8/ 34 7 个基因的阳性质粒共转染 COS-1 细胞,拯救出具有血凝性的重组病毒 R- HA- PR8 和 R- NA- PR8,说明 pAD- HA 和 pAD- NA 2 个重组质粒通过同一个载体转染后,利用细胞中的 pol I 和 pol II RNA 聚合酶,实现了 *HA* 与 *NA* 基因 vRNA 和 mRNA 的转录和表达。此外,本研究在该试验的基础上进行了 H1N1 的拯救,获救 H1N1 重组病毒的血凝效价为 2^9 ,略高于 A 型流感病毒流行株 A/ shanghai/ 7/ 99(血凝效价为 2^7),这可能与重组病毒 H1N1 内部含有鸡胚高度适应特性 A/ PR/ 8/ 34 的基因有关,A/ PR/ 8/ 34 为鸡胚高度适应株,其作为骨架病毒能使拯救出的重组病毒达到很高的血凝效价;高的血凝效价是构建疫苗候选株时需要考虑的重要因素,因为可以保证足够的抗原量并降低成本。本试验还进行了获救病毒 H1N1 的传代,传至第 4 代获救病毒 H1N1 的基因 *HA* 和 *NA* 序列仍与 A/ shanghai/ 7/ 99 一致,说明获救的病毒稳定,保持了其抗原特性。本研究结果为今后 A 型人流感病毒新型疫苗的开发研制奠定了基础。

(下转第 24 页)

- [14] 张若寒. 植酸酶的潜在营养价值[J]. 中国饲料, 1999(10): 24-25.
- [15] 丁宏标, 黄水生. 玉米-豆粕型肉鸡日粮中添加重组植酸酶效果的研究[J]. 动物营养学报, 2002, 14(2): 19-22.
- [16] 动物营养委员会家禽分会(NRC). 家禽营养需要[M]. 9 版. 蔡辉益, 文生, 杨禄良, 译. 北京: 中国农业出版社, 1994.
- [17] 霍启光. 饲料生物学评定技术[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996.
- [18] 杨胜. 饲料分析及饲料质量检测技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993.
- [19] 刘胜杰, 曲宁, 元晓梅. GB/T 5009.153-2003 植物性食品中植酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [20] 黄遵锡, 章克昌. 植酸在饲料工业的生物学作用[J]. 饲料研究, 1998(9): 15-16.
- [21] Leslie A J. The ever-increasing role of biotechnology in the poultry industry: lessons from the past and thoughts for the future[R]. Nicholasville K Y. Alltech's 10th Annual Asia-Pacific Lecture Tour, 1996: 65-84.
- [22] Biehl R R, Baker D H, Deluca H F. α -Hydroxylated cholecalciferol compounds act additively with microbial phytase to improve phosphorus, zinc and manganese utilization in chicks fed soy-based diets[J]. Journal of Nutrition, 1995, 125(9): 2407-2416.
- [23] Ravindram V, Bryden W L. Influence of dietary phytic acid and available phosphorus levels on the response of broilers to supplemental Nataphos[EB/OL][2006-04-5] http://www.chinafeed.org.cn/cms/_code/business/include/php/135197.htm
- [24] 吉红. 鱼用植物性蛋白饲料中抗营养因子的影响及其对策[C]//汪傲. 饲料毒物与抗营养因子研究进展. 西安: 西北大学出版社, 1997: 103-105.
- [25] 张克英, 陈代文, 余冰, 等. 饲料中添加植酸酶对断奶仔猪生长性能及蛋白质、氨基酸和磷利用率的影响[J]. 动物营养学报, 2001, 13(3): 19-22
- [26] Arie K K, Walter J G, Johan W, et al. Mineral absorption and excretion as affected by microbial phytase, and their effect on energy metabolism in young piglets[J]. Journal of Nutrition, 2005, 135: 1131-1138.
- [27] Shirley R B, Edwards H M. Graded levels of phytase past industry standards improves broiler performance[J]. Poultry Science, 2003, 82(4): 671-680.

(上接第 18 页)

[参考文献]

- [1] Clade H, Francoise M, James P. Immunogenicity and protective efficacy of influenza vaccination[J]. Virus Research, 2004, 103: 133-138.
- [2] Reid A A, Fanning T G, Hultin J V. Origin and evolution of the 1918“Spanish”influenza virus hemagglutinin gene[J]. Proc Natl Sci, 1999, 96: 1651-1656.
- [3] Ferguson N M, Galvani A P, Bush R M. Ecological and immunological determinants of influenza evolution[J]. Nature, 2003, 422: 428-433.
- [4] Takada A, Kuboki N, Okazaki K. Avirulent avian influenza virus as a vaccine strain against a potential human pandemic[J]. J Virol, 1999, 73(10): 8303-8307.
- [5] Neumann G, Kawaoka Y. Synthesis of influenza virus: new impetus from and old enzyme, RNA polymerase I[J]. Virus Res, 2002, 82: 153-158.
- [6] Neumann G, Kawaoka Y. Reverse genetics of influenza virus[J]. Virology, 2001, 287: 243-250.
- [7] Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids[J]. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97: 6108-6113.
- [8] Hoffmann E, Krauss S, Perez D, et al. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines[J]. Vaccine, 2002, 20: 3165-3170.
- [9] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses[J]. Arch Virol, 2001, 146: 2275-2289.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南: 现代生物技术译丛[M]. 2 版, 金冬雁, 译. 黎孟枫, 校. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] 郭元吉, 程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术[M]. 北京: 中国三峡出版社, 1997.
- [12] Lawson N D, Stillman E A, Whitt M A, et al. Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 4477-4481.
- [13] Radecke F, Spielhofer P, Schneider H, et al. Rescue of measles viruses from cloned DNA[J]. EMBO J, 1995, 14: 5773-5784.
- [14] Schneider H, Spielhofer P, Kaelin K, et al. Rescue of measles virus using a replication-deficient vaccinia-T7 vector[J]. J Virological Methods, 1997, 64: 57-64.
- [15] Takeda M, Takeuchi K, Miyajima N, et al. Recovery of pathogenic measles virus from cloned cDNA[J]. J Virol, 2000, 74: 6643-6647.