

## 【论著】

# 血凝素蛋白裂解位点对 H5 亚型禽流感病毒侵入细胞的影响

刘华雷<sup>1</sup>, 王志亮<sup>1</sup>, 周滨<sup>2</sup>, 陈溥言<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的 通过 RT-PCR 反应获得了 H5N1 亚型禽流感病毒完整的血凝素基因 (HA) 并克隆到真核表达载体 pcDNA3 上, 通过转染 293T 细胞进行了瞬时表达验证。方法 采用 PCR 定点突变技术, 将其 HA 基因裂解位点的氨基酸组成由 RKKR-CLF 突变为 RSSR-CLF, 使其具有低致病性 AIV 的分子特征, 并构建了表达突变后 HA 基因的真核表达载体 pcDNA-Hm。将 pcDNA-H5 和 pcDNA-Hm 分别与 MuLV 假病毒构建体系的两种质粒 pHIT60 和 pHIT111 共转染转化了 SV40 大 T 抗原的人胚肾细胞 293T 后, 收集转染细胞上清, 通过 Western-blot 和细胞感染性实验来研究假病毒的特性。用缺乏囊膜蛋白和已经证实可以形成 MuLV 假病毒的水泡性口炎病毒糖蛋白 G 作为对照。结果 转染后形成假病毒进行裂解后进行 Western-blot 证明两种 HA 蛋白都能够整合到各自的假病毒颗粒表面, 野生型的 HA 可以检测到三条带, 分别与 HA0、HA1 和 HA2 大小相符, 而突变后的 HAm 则仅能检测到一条带, 与 HA 前体大小相符, 说明其失去了裂解活性。通过感染 293T、COS-7 和 NIH3T3 三种不同的靶细胞后发现野生型的 HA 所形成的假病毒 MuLV-H5 具有感染性和泛嗜性, 而突变后的 HA 所形成的假病毒则失去了感染性。结论 可以得出 HA 蛋白裂解位点的氨基酸组成不仅对 H5 亚型禽流感病毒的致病性有影响, 对禽流感病毒侵入细胞也具有至关重要的作用。

**【关键词】** 鼠白血病毒; 禽流感病毒; H5N1 亚型; 血凝素; 假病毒; 裂解位点

**Influence of the Cleavage Site for Hemagglutinin Protein on the Cellular Entry of H5 Subtype Avian Influenza Virus** LIU Hua-lei<sup>\*</sup>, WANG Zhi-liang, ZHOU Bin, et al.<sup>\*</sup> China Animal Healthy and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China

**【Abstract】** **Objective** To study the influence of the cleavage site of hemagglutinin Protein on the cellular entry of H5 subtype of AIV. **Methods** Hemagglutinin (HA) gene of H5N1 subtype AIV isolated from goose in China were amplified by RT-PCR and cloned into pcDNA3.0 vector, named as pcDNA-H5. The site-directed mutagenesis of HA gene was made by PCR. The mutation amino acid sequences at the cleavage site of the H5 subtype HA protein was changed from RKKR-CLF to RSSR-CLF. The amplified fragments contained the mutation site were cloned into the pcDNA3 vector, named as pcDNA-Hm. HA-expression plasmids pcDNA-H5 and pcDNA-HM were co-transfected with plasmids expressing Murine Leukemia Virus (MuLV) Gag-Pol and a retroviral vector genome, namely pHIT60 and pHIT111 into 293T cells respectively. The characteristic of the pseudotyping particles were analysis by Western-blot and infection test. Parallel transfections were carried out with supernatants produced in absence of a viral envelope and with the vesicular stomatitis virus (VSV) G proteins, which is known to efficiently pseudotype MuLV. **Results** Western-blot revealed the two kinds of HA proteins can incorporated into the retroviral particles. Three distinct bands could be detected in the pseudotyped virus with wild type HA, which were consisted with HA0, HA1 and HA2 of H5 subtype virus respectively, while the pseudotyped virions with HA mutant was one band, which was consisted with HA0 of H5 subtype virus, indicated that it had lost the ability for lysis. Infection tests were performed on 293T, NIH3T3 and COS-7. The pseudotyped MuLV-H5 virus which incorporated with wild type HA was Lac Z negative, indicated it was infectious, but the recombinant retrovirus with mutant HA was not infectious. **Conclusions** The cleavage site of the hemagglutinin HA protein plays a key role, not only in the pathogenicity, but also in the entry mediated by hemagglutinin.

**【Key words】** Murine leukemia virus; Avian influenza virus; H5N1 subtype; Hemagglutinin gene; Pseudotype

假病毒是指一种反转录病毒的囊膜蛋白被另外一种病毒的囊膜蛋白所置换, 而基因组仍保持反转录病毒本身的特性。带有异源病毒囊膜糖蛋白的假病毒作

为研究病毒的侵入模型是非常安全的, 因为其仅能单循环感染 (复制缺陷型), 能够获得异源病毒的宿主范围, 因此便于研究病毒的侵入机制、组织嗜性、中和抗体分析以及受体的鉴定等。对于一些危险病毒, 如 SARS 冠状病毒, 埃博拉病毒, 丙肝病毒等, 用假病毒技术来研究这些病毒囊膜糖蛋白的功能及其受体

作者单位: 1. 农业部动物检疫所 国家外来动物疫病诊断中心, 山东青岛 266032; 2. 南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 210095

的特性无疑提供了一种良好的工具。国外已经建立了一系列以反转录病毒为载体构建的假病毒体系, 如人免疫缺陷病毒、丙型肝炎病毒、埃博拉病毒、SARS 冠状病毒、水泡性口炎病毒等<sup>[1]</sup>。禽流感 (avian influenza, AI) 是严重危害畜牧业及公共卫生环境的一种传染性疾病, 其病原为禽流感病毒, 属正黏病毒科, 分节段单股负链 RNA 病毒。高致病性 AIV (HPAIV) 感染禽类所导致的禽流感对养殖业具有毁灭性的打击, 故被世界动物卫生组织 (OIE) 规定为 A 类疾病, 被我国农业部列为 I 类传染病, 并被列入国际生物武器公约动物类传染病范围<sup>[2]</sup>。根据 A 型流感病毒表面糖蛋白血凝素 (H) 和神经氨酸苷酶 (N) 的抗原关系程度可将其进一步分为不同的亚型。到目前为止, 国际上已经鉴定了 16 种 H 亚型 (H1 ~ H16) 和 9 种 N 亚型 (N1 ~ N9)<sup>[3]</sup>。最近 H5N1 禽流感病毒感染人的事件表明禽流感病毒具有重要的公共卫生意义<sup>[4]</sup>。因此, 必须分析这些病毒的进化和特

性。禽流感病毒 (AIV) 的表面结构蛋白血凝素 (HA) 在决定病毒致病力、受体结合特性、宿主范围等方面起着关键作用。HA 糖蛋白在介导禽流感病毒侵入细胞过程中起着决定性作用, 它不仅可以与靶细胞表面的受体结合, 还可以启动膜融合过程。因此, 我们选取了 H5N1 禽流感病毒国内分离株对其侵入细胞的机制进行了探索。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒和细胞

含有 H5 亚型禽流感病毒完整 HA 基因的质粒 pGEM-H5 由作者自己构建保存; MuLV 假病毒构建体系的两种质粒 pHIT60 和 pHIT111 (图 1)、水泡性口炎病毒糖蛋白 G 表达质粒 pVSV-G、表达 SV40 大 T 抗原的人胚肾细胞 293T 均由美国 UIC 荣立军教授惠赠; 真核表达质粒 pcDNA3、鼠成纤维细胞 NIH 3T3 和非洲绿猴肾细胞 COS-7 细胞由本实验室保存。

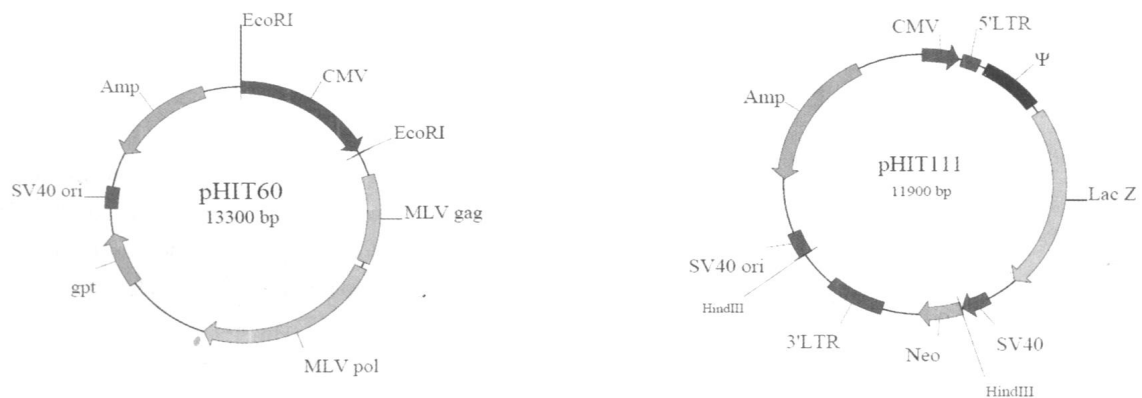


图 1 本研究中的应用的反转录病毒载体图例

### 1.2 主要试剂及工具酶

AMV 反转录酶购自 Promega 公司; T4 DNA 连接酶、rTaqDNA 聚合酶、限制性内切酶 Hind III 和 BamH I、dNTPs、DNA Marker 等购自大连宝生物公司; H5 亚型禽流感病毒的标准阳性血清由哈尔滨兽医研究所提供; RNA 提取试剂盒 RNAgents Total RNA Isolation System、细胞裂解液 (Cell Lysis Buffer, CLB) 和兔抗鸡 IgY 酶标二抗为 Promega 公司产品; 酶切片段回收试剂盒 QIAquick Gel Extraction Kit 购自 QIAGEN 公司; DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; DMEM 培养基为 GIBCO 公司产品; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司。

### 1.3 引物设计

1.3.1 HA 基因扩增片段的引物设计: 参照 GenBank 中发表的序列, 在 HA 基因起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA 分别设计一对引物: P1 5' - CAAAGCT-

TATGGAGAGAATAGTGC - 3' (含有 Hind III 酶切位点); P2 5' - TAGGATCCTTAAATGCAAATCTG - 3' (含有 BamH I 酶切位点)。预计扩增片段的大小为 1.7 kb。引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.3.2 HA 基因裂解位点突变体的引物设计: 按照引物设计原则, 采用引物设计软件 (Primer 5.0), 根据 H5 亚型禽流感病毒的 HA 基因序列 (AY639405) 和 H9 亚型禽流感病毒 HA 基因 (AY364228) 分别设计两条引物, P3 和 P4。P3: TAGICCTCTGCTGGATCT-TATICT; P4: GAGAAATAAGATCCAGCAGAGGACTA。P3 和 P4 互补, 且都带有突变位点, 即在裂解位点引入两个氨基酸的突变, 即: 在 344 位的赖氨酸 K (AAA) 突变为丝氨酸 S (ACC), 第 345 位的赖氨酸 K (AAG) 突变为丝氨酸 S (AGT)。引物由大连宝生物工程有限公司合成。

### 1.4 HA 基因的扩增及真核表达载体的构建

应用引物 P1、P2 按照常规方法扩增出 H5 亚型禽流感病毒完整的 HA 基因并克隆到 pcDNA3.0 载体上采用酶切和测序进行鉴定。其中 PCR 反应条件为：95 预变性 5 min；94 变性 1 min、54 退火 1 min、72 延伸 3 min，进行 30 个循环；最后 72 延伸 10 min，4 保存。序列测定由大连宝生物工程有限公司完成。

### 1.5 HA 基因裂解位点突变体的构建

详见文献[5]：采用 SOE 方法，通过三次 PCR 扩增，在 HA 的裂解位点成功引入突变，对酶切鉴定为阳性的克隆进一步进行测序鉴定，确认是否在裂解位点已经引入定点突变以及排除在反应过程中有无随机产生新的突变。

### 1.6 禽流感病毒 HA 蛋白假病毒体系的建立

1.6.1 假病毒上清的获得：转染前 1 d，在 100 mm 培养皿上培养  $2.5 \times 10^6$  个人胚肾细胞 293T 细胞。将质粒 pcDNA - H5 和 pcDNA - Hm 分别与 pHIT60 和 pHIT111 各 10  $\mu$ g 采用磷酸钙方法共转染 293T 细胞，用 pHIT60、pHIT111 和 pVSV - G 三种质粒共转染作为阳性对照，用 pHIT60、pHIT111 和 pcDNA3.0 三种质粒共转染作为阴性对照。转染 48 h 后，取转染细胞上清，3 000 r/min 低速离心 5 min 去除细胞碎片，0.45  $\mu$ m 滤膜过滤，-80 冻存备用。

1.6.2 HA 在假病毒颗粒表面的表达：取处理过的假病毒上清，20% 蔗糖垫底 22 000 r/min 超速离心 2 h，用适量 PBS 悬浮病毒沉淀。然后加入等量的 2 $\times$ 裂解缓冲液煮沸裂解 5 min，采用 Western - blot 检测两种 HA 在假病毒颗粒表面的表达情况，其中一抗为 H5 亚型禽流感病毒特异性多抗，稀释度为 1 100；二抗为兔抗鸡 IgY 辣根过氧化物酶标记抗体，稀释度为 1 1 000。最后用 DAB 试剂盒显色。

1.6.3 假病毒感染性测定：感染前 24 h 在 6 孔板上分别接种 293T、NIH3T3、COS - 7 三种细胞，感染时每孔取 1 ml 处理过的假病毒上清，加入 Polybrene (终浓度为 8  $\mu$ g/ml)，吸附 2 h 后加入含 10% 血清的 DMEM 完全培养基，16 h 后换新鲜完全培养基，48 h 后每孔加入 200  $\mu$ l 报告基因裂解缓冲液 (RLB) 室温充分裂解细胞，按照 Promega 公司 Lac Z 检测试剂盒说明书进行裂解细胞，检测报告基因 Lac Z 的表达，用 pVSV - G 作阳性对照。

## 2 结果

2.1 HA 基因裂解位点突变体的构建及真核表达鉴定以重组质粒 pcDNA - H5 为模板，采用 SOE 方法，通过 3 次 PCR 方法，在 HA 裂解位点成功引入突变位点。测序表明，在 HA 基因的第 344 位的密码

子 AAA (赖氨酸 K) 突变为 AGC (丝氨酸 S)，第 345 位的 AAG (赖氨酸 K) 突变为 AGT (丝氨酸 S)，其余的序列与正常 H5 基因完全相同，说明成功引入了预期突变。同时对 HA 基因其他片段进行测序表明，未发现随机突变的产生，测序结果不一一显示。

### 2.2 HA 在 HA - MuLV 假病毒颗粒表面的表达

取处理过的 10 ml 假病毒上清经 20% 蔗糖垫底进行超离，用 500  $\mu$ l PBS 悬浮沉淀后裂解，用 H5 多抗和羊抗鸡酶标二抗进行 Western - blot (图 2)，结果 MuLV - H5 假病毒具有特异性的三条带，分别与 H5 亚型 HA 蛋白的前体蛋白 HA0、裂解后形成的 HA1 和 HA2 大小相符，说明 HA 在 MuLV - H5 假病毒颗粒表面得到了表达；而 MuLV - Hm 仅形成一条条带，与 HA 前体大小类似，说明突变后的 Hm 在 MuLV - Hm 颗粒表面也获得了表达，但失去了裂解活性。



图 2 免疫印迹分析 MuLV - Hm 假病毒

### 2.3 假病毒感染性测定

假病毒上清在感染 293T、COS - 7 和 NIH3T3 三种细胞 48 h 后检测报告基因 Lac Z 的表达。结果证明 MuLV - H5 假病毒和阳性对照 MuLV - VSV - G 假病毒均能感染 293T、COS - 7 和 NIH3T3 三种细胞，但 MuLV - H5 的病毒滴度要比 MuLV - VSV - G 的滴度稍低 (图 3)，而突变后的 HA 所形成的假病毒 MuLV - Hm 则几乎没有感染性，说明裂解位点的组成对禽流感病毒侵入细胞具有决定性作用。

## 3 讨论

禽流感 (Avian Influenza, AI) 是由禽流感病毒引起的一种从呼吸系统到全身性败血症等多种症状的传染性疾病综合征<sup>[2]</sup>。根据表面糖蛋白血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 的抗原性差异可分为不同的亚型，到目前为止，已经鉴定了 16 种 H 亚型 (H1 ~ H16) 和 9 种 N 亚型 (N1 ~ N9)<sup>[3]</sup>。近年来 H5N1 和 H9N2 等亚型的禽流感病毒感染人的事件，表明家禽

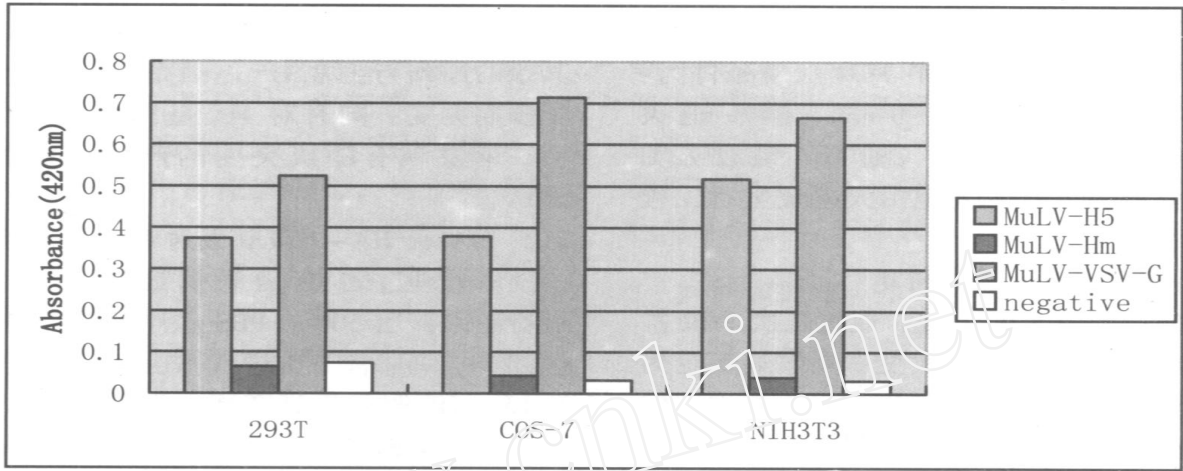


图 3 假病毒感染性测定结果

是禽流感人畜传播潜在的中间宿主<sup>[4]</sup>。这也使得世界各国对禽流感的关注程度大大提高。因此，开展对禽流感病毒的研究，从分子水平掌握禽流感病毒的流行规律和致病机制，不仅在病毒学、兽医学等学科上有重要的学术意义，而且在公共卫生等方面也具有重大的社会意义。通过对我国从水禽分离到的一株 H5N1 亚型 AIV 血凝素基因的克隆与序列分析，表明其 HA 基因共有 1 707 个核苷酸，包含了 HA 基因完整的编码区，共编码 568 个氨基酸，其中前 16 个氨基酸为信号肽序列，主要是由疏水性氨基酸组成，其功能主要是使得蛋白质能被定向转运，在成熟的 HA 蛋白中并不包括信号肽。成熟的 HA1 蛋白有 329 个氨基酸，HA2 有 223 个氨基酸，其 N 段的 14 个氨基酸构成了 HA 蛋白的融合肽。HA 蛋白裂解位点的氨基酸组成为 RKKR GLF，含有连续的碱性氨基酸，具有高致病性 AIV HA 基因裂解位点的序列特征，符合高致病力毒株的分子特征。1997 年 4 月，我国香港 3 个鸡场暴发 H5N1 型禽流感，随后在 1 名 3 岁男童的气管分泌物中分离出 1 株 H5N1，截止 1998 年 2 月，确诊共有 18 人感染 H5N1 并发病，其中 6 人死亡。经过对期间分离的毒株 8 个基因片段的序列分析，并分别与人源和禽源流感病毒进行比较，发现与该病毒 8 个基因片段同源率最高的毒株均为 AIV，未发现任何曾经在中间宿主中与人流感病毒发生重排的证据，由此分析该病毒来源于禽类<sup>[6]</sup>。2003 年 2 月我国香港再次发生 H5N1 直接感染人事件（感染 2 例，1 例死亡）。2004 年禽流感突然袭击了亚太地区，10 个国家和地区受影响并造成了巨大的损失，在 2005 年又卷土重来，并且在越南、泰国、印尼和中国等多个国家和地区发现高致病性禽流感病毒感染人并致死的事件，更突出地显示了禽流感特别是高致病性禽流感的

公共卫生学意义。

假病毒技术在研究病毒侵入细胞时的优点包括：研究病毒的侵入和组织嗜性安全性好，因为构建的假病毒为复制缺陷型，只能进行单循环的感染，所以对于一些高致病性和烈性传染病来说研究其受体和侵入细胞的过程假病毒技术无疑提供了一种良好的工具；病毒的基因容易操作，因为突变等都是在 DNA 水平上进行的；此外，假病毒技术还可以用来筛选病毒的受体以及快速筛选抑制病毒侵入的抑制剂等。目前最常用的假病毒构建体系为 MuLV 基础上构建的反转录病毒的载体和包装组分<sup>[1]</sup>。对于 MuLV 系统来说，主要由 3 个质粒组成，分别为 MuLV 基因组质粒（包括包装信号、标记基因 *LacZ*）、MuLV 结构蛋白表达质粒（*gag*, *pol*）和外源囊膜表达质粒。对于 MuLV 的两种包装组分，即 *gag-pol* 和 *env* 蛋白，由于是放在两个单独的表达质粒上，减少了辅助病毒产生的可能性<sup>[7]</sup>。在流感方面，Dong 于 1992 年首次证实流感病毒的血凝素蛋白能够有效整合到 RSV 颗粒上，并保留了其生物学活性，能够感染多种宿主细胞。对于不易裂解的流感病毒的 HA 也能够整合到病毒颗粒上，但这种假病毒只有在通过胰酶处理、裂解活化后才具有感染性，可以感染人和禽的细胞<sup>[8]</sup>。Theodora 等<sup>[9]</sup>于 1998 年证实 H7 亚型高致病性禽流感病毒的 HA 能够表达、正确加工并能稳定地整合到 MLV 的病毒颗粒上，带有 HA 的假病毒能够感染许多宿主细胞类型。与带有野生型 MLV 囊膜的病毒相比低 10 个滴度，其推测可能的原因包括：HA 相对于 MLV 本身的囊膜来说整合不牢固；HA 糖蛋白的细胞毒性作用；缺少同源的流感病毒的蛋白如神经氨酸酶（可以防止唾液酸介导的病毒的聚集和促进出芽病毒颗粒从细胞表面的释放）或者 M2 - 质子泵（可以通

过提高运输囊泡的 pH 值防止 HA 错误折叠)。本研究在国内首次证实 H5N1 亚型禽流感病毒的 HA 蛋白能够整合到鼠白血病病毒 MuLV 颗粒表面, 并保留了其侵入细胞的生物学功能。成功构建了 H5N1 亚型禽流感的 MuLV 假病毒体系, 经过 Western - blot 发现 HA 在形成的假病毒颗粒表面得到了表达。通过感染性实验发现, 其形成的假病毒具有感染性, 能够感染 293T、COS - 7 和 NIH3T3 等多种细胞, 说明在这些细胞表面均有 H5N1 亚型禽流感病毒 HA 蛋白的受体, 表明其具有泛嗜性。HA 是构成病毒囊膜纤突的主要成分之一, 是典型的 I 型糖蛋白, 以三聚体形式存在于囊膜的表面。HA 在病毒吸附及穿膜过程中以及决定病毒致病力方面均起关键作用, 它能否被裂解为 HA1 和 HA2 是病毒感染细胞的先决条件, 也是决定病毒致病力高低的重要因素, 病毒毒力的强弱与 HA 能否被裂解为 HA1 和 HA2 呈正相关。HA 能否裂解为 HA1 和 HA2 关系到该病毒粒子致病力的强弱, 而 HA 对蛋白酶裂解的敏感性直接影响到病毒的毒力。HPAIV 在裂解位点处有多个碱性氨基酸 (Arg, Lys), 能为泛在性的蛋白酶裂解而引起全身感染, 存在于大多数真核细胞中的细胞内枯草溶菌素样切蛋白酶, 可促进 HA 的切割活化作用<sup>[2]</sup>。而特异性细胞蛋白酶识别、切割不同亚型 HA 糖蛋白的能力决定病毒在宿主中的传播。由于宿主的大多数细胞均有内切蛋白酶, 因此, HA 切割作用范围广, 进而导致严重病变和高死亡率。非致病性毒株在 HA 裂解位点处只有一个精氨酸 (Arg), 使其对蛋白酶的敏感性较低, 因此它只能在呼吸道和胃肠道中增殖, 引起局部亚临床感染。正因为 HA 是由宿主细胞的蛋白酶作用下裂解的, 所以不同宿主细胞因具有或不具有裂解 HA 的蛋白酶而对 HA 的裂解能力有差别。我们利用 PCR 介导的定点突变技术, 将 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒 HA 基因裂解位点的氨基酸序列由 RKKR CLF 突变为 RSSR CLF, 减少了其裂解位点的碱性氨基酸数目, 使之变为典型的低致病性禽流感病毒 HA 蛋白的裂解特征, 因而大大降低了其在宿主细胞中的可裂解性。

对于一个假病毒体系来说, 所插入的目的外源蛋白必须能够在所形成的假病毒颗粒表面得到表达, 而且所形成的假病毒必须具有感染性。本研究利用

MuLV 假病毒构建系统, 构建了 H5 亚型禽流感病毒 HA 蛋白裂解位点突变体的假病毒, 利用野生型 H5 亚型的假病毒作为参照, 对 H5N1 亚型禽流感病毒裂解位点对侵入细胞的影响进行了探索。我们发现, HA 突变体虽然能够整合到 MuLV 的颗粒表面, 利用 Western - blot 检测到突变的 HA 蛋白能在 MuLV 颗粒表面表达, 但所形成的假病毒不具有感染性。由于禽流感病毒 HA 被宿主细胞的蛋白酶裂解成 HA1 和 HA2 是其感染细胞的先决条件, 我们推测可能由于 H5 亚型裂解位点的突变体采用非碱性氨基酸替换到原来的碱性氨基酸, 使得 HA 蛋白在宿主细胞中的可裂解能力大大降低, 从而影响了其前体的有效裂解, HA2 的融合肽不能暴露, 从而没有感染细胞的能力。因此, 裂解位点不仅对禽流感病毒的毒力有影响, 对其侵入细胞也具有重要的作用。

#### 参 考 文 献

- [1] David AS. No false start for novel pseudotyped vectors. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13: 437 - 442.
- [2] 甘孟侯主编. 禽流感. 北京: 北京农业大学出版社, 1995. 1 - 79.
- [3] Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black - headed gulls. *J Virol*, 2005, 79: 2814 - 2822.
- [4] 郭建顺, 金宁一. 高致病性禽流感及其公共卫生学. *中国生物制品学杂志*, 2004, 17: 126 - 128.
- [5] 刘华雷, 魏建超, 周斌, 等. 禽流感病毒血凝素基因突变体的构建及其在 293T 细胞中的表达. *微生物学报*, 2005, 45: 614 - 616.
- [6] Subbarao K, Klimov A, Katz J, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, 1998, 279: 393 - 396.
- [7] Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE, et al. A transient three - plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 628 - 633.
- [8] Dong J, Roth MG, Hunter EA. A chimeric avian retrovirus containing the influenza virus hemagglutinin gene has an expanded host range. *J Virol*, 1992, 66: 7374 - 7382.
- [9] Theodora H, Sandrine VW, Stephen JR, et al. Incorporation of fowl plague virus hemagglutinin into murine leukemia virus particles and analysis of the infectivity of the pseudotyped retroviruses. *J Virol*, 1998, 72: 5313 - 5317.

(收稿日期: 2006 - 05 - 18)

欢迎广大学者、预防医学工作者、读者踊跃投稿