

流感病毒的反向遗传学研究进展

程从升(综述),舒跃龙*,张智清(审校)

(中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所,北京 100052)

中图分类号:R373.1 文献标识码:A 文章编号:1000-8721(2007)01-0068-04

反向遗传学是指对病原微生物的 cDNA 进行目的性修饰,以对其进行功能和表型的分析^[1]。它是相对于经典遗传学而言的,后者是从生物的性状、表型到遗传物质来研究生命的发生与发展规律。反向遗传学则是在获得生物体基因组全部序列的基础上,通过对靶基因进行必要的加工和修饰,如定点突变、基因插入/缺失、基因置换等,再按组成顺序构建含生物体必需元件的修饰基因组,让其装配出具有生命活性的个体,研究生物体基因组的结构与功能,以及这些修饰可能对生物体的表型、性状有何种影响等方面的内容。与之相关的研究技术称为反向遗传学技术。在病毒学研究中,反向遗传学常利用经修饰的克隆化 cDNA 用来获得有感染性的病毒,从而可研究这些修饰对表型产生哪些影响。最早报道的是正链 RNA 病毒的反向遗传学系统。将来自正链 RNA 的病毒全基因组 RNA 转染真核细胞,可使 RNA 充任 mRNA(s),从而可翻译出病毒蛋白;反过来,这些蛋白又有助于完整病毒的包装。

与正链 RNA 病毒不同,负链 RNA 病毒的基因组无信使功能并且无感染性。从病毒 RNA 开始转录需要病毒的核糖核蛋白复合体(RNP)的存在。RNP 对病毒 RNA 转录为 mRNA 和病毒基因组的复制是必须的。利用反向遗传学,从 cDNA 获得的第一个完整负链 RNA 病毒是狂犬病毒。另有一些研究者对 Senda、Ebola 病毒进行了反向遗传学研究,但拯救效率较之正链 RNA 病毒低得很多。

分节段的负链 RNA 病毒的反向遗传学操作尤显困难。通过努力,分节段的负链 RNA 病毒的反向遗传学最终在布尼亚病毒上获得突破,并随后在流感病毒等取得了一系列进展。此文就流感病毒的反向遗传学的发展历史及其应用作一综述。

1 流感病毒的反向遗传学发展概述

流感病毒属正粘病毒科成员。同多数负链 RNA 病毒不同,流感病毒在感染细胞的核内完成复制。在受体介导的吞饮和膜融合之后,病毒的核糖核蛋白复合体(vRNP)释放入细胞浆。vRNP 包括病毒 RNA、核蛋白(NP)和 3 个多聚酶蛋白(PB1、PB2 和 PA),被运送至细胞核,在此完成转录和复

制。负链的病毒 RNA 不能作为蛋白质合成的直接模板。相反,NP 包裹的 vRNA 必须经病毒多聚酶转录为 mRNA。在复制中,病毒 RNA 作为全长互补 RNA(cRNA)的合成模板;合成的 cRNA 又可作为子代病毒 RNA 的合成模板。所以流感病毒复制的最小功能单位是 vRNP 复合物。故 A 型流感病毒的产生需要 8 个功能性的 RNP 复合物,并且这 8 个复合物必须进入细胞核^[2]。

在实验室水平体外产生病毒始于 20 世纪 80 年代。其时已从感染的细胞和变性剂处理的病毒中获得具有复制功能的 vRNP,其后有学者又证实了 vRNP 的体外活性。1989 年,Parvin 等和其同事获得了从克隆化 cDNA 获得的 vRNA 的病毒^[3],从而首次建立了对负链 RNA 病毒进行体外修饰的系统,揭开了重配病毒研究的新篇章。Enami 等^[4]将体外转录后的 vRNA、纯化的 NP 和多聚酶蛋白装配成 RNP 复合物。但是这个系统所产生的子代病毒多是辅助病毒,所以需要从抗体介导的生长限制作用、温度敏感性、宿主限制型和抗性等方面进行严格的筛选。1994 年,Hobom 等^[5]利用 RNA 多聚酶 I 来合成病毒 RNA,从而把流感病毒的反向遗传学研究推向一个新的高度。RNA 多聚酶 I 是细胞核内含量丰富的酶,它能转录没有 5 帽子和 3 尾巴的 rRNA(类似于流感病毒的 vRNA),此外,该酶还能在特定的启动子和终止子序列处启动或终止转录。因此 RNA 多聚酶 I 的转录产物在 5 端和 3 端没有冗余的核酸。RNA 多聚酶 I 系统比 RNP 直接转染系统更为有效,因为它能进行体外转录、蛋白质纯化和体外 RNP 装配。但是该系统在上述系统一样,存在病毒产毒量特别低的缺点。

随着狂犬病毒的感染性 cDNA 克隆的诞生和一个分节段的负链 RNA 病毒 - 布尼亚病毒的反向遗传学的成功,从克隆的 cDNA 产生流感病毒的技术难关终于在 1999 年得到突破。Neumann 研究小组^[6]构建了含 A/WSN/33(H1N1)全部 8 个基因片段的克隆,所有基因片段均置于人 RNA 多聚酶 I 启动子和鼠 RNA 多聚酶终止子序列之间,另外 9 个真核表达质粒负责病毒蛋白的合成,此即 17 质粒系统,在转染细胞上清中,产毒量达 1×10^7 /mL。随后,该小组对 17 质粒系统进行了改进,将负责蛋白合成的真核表达质粒改为 4 个,分别负责 PA、PB1、PB2 和 NP 的合成,以供病毒 RNA 的转录和复制之用。该系统称为 12 质粒系统,转染上清中能产生高达 1×10^8 /mL 的病毒粒子。其转染效率很高的原因在于,293T 细胞具有很高的转染效率,并且细胞中具有足够的 RNA 聚合酶 I,能随着细胞增殖保证 RNA 聚合酶 I 的供给。

收稿日期:2006-05-17;修回日期:2006-09-21

作者简介:程从升(1972-),男,安徽怀宁人,博士,主要从事分子病毒学研究,E-mail:cshengc@hotmail.com

*通讯作者:舒跃龙,研究员,E-mail:yshu@vip.sina.com,Tel:86-10-63577499

Hoffmann 等^[7]对 RNA 聚合酶 I 系统进行了改进。编码病毒基因片段的 cDNA 以负链方向克隆于 RNA 聚合酶 I 启动子和终止子序列之间;构建好的表达盒又正向插于 RNA 聚合酶 II 启动子和牛生长激素 poly(A) 信号之间。这样, RNA 聚合酶 I 负责转录产生负链病毒 RNA, 而 RNA 聚合酶 II 负责正链 mRNA 的合成, 从同一模板便可同时产生 vRNA 和 mRNA, 无需另外的质粒来负责蛋白质合成。这个系统称为 8 质粒系统, 有助于不能高效转染的细胞系产生重配病毒。另外, 这个系统避免了在一个或多个基因片段产生致死性突变的病毒样颗粒的产生。8 质粒拯救系统相对于 17/12 质粒系统, 减少了表达各病毒蛋白的质粒, 使拯救时需要转染细胞的质粒数大大减少, 因此提高了病毒拯救效率。相当于 RNA 聚合酶 + 辅助病毒系统, 但由于没有辅助病毒的使用, 从而免去了复杂的病毒筛选工作。没有外源(辅助)基因的干扰, 可以按预期计划获得目的重配病毒。

随后, Neumann 等^[8]探索了减少转染所需质粒数量, 以期提高转染效率。他们将负责病毒 RNA 合成的元件克隆到 1 个质粒上, 而把负责蛋白质合成的基因分别克隆到另外的载体上, 再进行不同的组合, 使转染所需质粒的数量减少为 1~6 个。例如, 和以前由每个质粒提供 RNA 多聚酶 I 和 II 转录盒不同, 他们把负责合成病毒 RNA 的 8 个 RNA 多聚酶 I 转录盒组合到 1 个质粒上; 同样地, 把负责病毒多聚酶单位合成的 PB2、PB1、PA 和 NP 分别克隆到 pCAWS 载体上, 5 个质粒共转染后, 病毒能在 Vero 细胞上大量增殖, TCID₅₀/mL 能达到 6.3×10^5 。这种改进, 克服了传统的鸡胚源疫苗的局限性, 也改变了既往的 17 或 12 质粒系统、8 质粒系统在疫苗允许细胞(例如 Vero 细胞)上转染效率低的缺点, 有利于高效快速地制备流感疫苗。

2 流感病毒反向遗传学的应用进展

2.1 流感病毒跨种属传播机制研究 高致病性禽流感病毒为何能从飞禽传播给哺乳动物? 又能否在人与人之间互相传播? 探讨这一可能性对有效防制流感至关重要。目前, 有关流感病毒跨种属传播机制的研究不多。反向遗传学可以用于从分子水平探讨流感病毒跨种属传播的可能性及其机制。例如, 目前一个最突出的问题是: 哪些基因的变化, 导致 H5N1 流感病毒获得在人类高效传播的能力? 解决这一问题, 可能就需要利用反向遗传学技术产生候选病毒, 结合一个合适的动物模型, 来模拟流感病毒在人与人之间相互传播, 以探讨其机制^[9]。

流感病毒的各个基因片段在流感病毒跨种属传播中扮演了什么角色, 又是哪些因素限制了其传播? Hatto 等在 12 质粒系统中^[10], 将人流感病毒 A/Memphis/8/88(H3N2) 的 HA、NA、NP、M、NS、PB2 分别更换禽流感病毒 A/Mallard/New York/6750/78(H2N2) 基因组中相应片段, 而保持禽流感病毒基因组中的其他基因片段不变。当仅替换 A/Memphis/8/88 的 HA 或 NA 片段时不能产生禽的病毒; 当同时替换人流感病毒的 HA 和 NA 片段时, 才得以成功拯救出活病毒颗粒。因此, HA 和 NA 之间的平衡对病毒复制是重要的, 毒株本身固有的温度敏感性可能也是一个重要的限制因素。与之相似, 包含人流感病毒 PB1 或 PA 基因的重配禽流感病毒未能产生, 而包含所有的人流感病毒三个聚合酶基因的

重配病毒得到拯救。但此病毒却不能在鸭的肠道中复制, 可能是因为它和禽流感病毒的宿主细胞因子不兼容。

已知猪的呼吸道上皮细胞存在禽流感和人流感病毒的受体, 所以存在禽流感通过猪感染人的危险。Gabriele 等^[11]保持人流感病毒(Sw/ONT) 其他 6 个片段不变, 采用 8 质粒系统, 将猪 H3N2 毒株(Sw/MN) 的 HA/NA 取代人 H3N2 病毒的 HA/NA, 得到的重配病毒(Sw/ONT+MN HA/NA), 在病毒出芽率和致病性方面较供体株有所增强; 反之, 将人流感病毒的 HA/NA 片段置换猪流感病毒相应片段, 则重配病毒(Sw/MN+ONT HA/NA) 出芽率和致病性下降。由此说明 HA/NA 对人的流感病毒感染株起着重要作用, 从而推测在猪的细胞中存在种属屏障, 限制了人流感病毒和禽流感病毒在猪体重配而产生流感大流行的可能性。

Taubenberger 等^[12]则利用 12 质粒系统成功地拯救了 1918 年的流感病毒。其研究结果揭示, 现在流行的 H5N1 病毒基因必须发生一定的变化, 才有可能通过低滴度的气溶胶传播给人, 并由此造成流感大流行。其中, PB1 基因扮演着关键的角色, 因为在 1957 年和 1968 年流感病毒重配过程中, 多聚酶基因随血凝素基因一起发生转移。比较三株禽流感病毒和人西班牙流感病毒的 PA、PB1 和 PB2 中保守序列, 发现 PA 中的 4 个氨基酸(55N、100A、382D、552S)、PB1 中的 1 个氨基酸(375S) 和 PB2 中的 5 个氨基酸(199S、475M、567N、627K、702R), 仅存在于人流感病毒(包括 1918 年病毒), 在禽流感病毒中未发现。进一步研究表明, 这些氨基酸只见于人流感病毒的核定位信号区。这些氨基酸的部分或全部差异对禽流感病毒传播到人至关重要。Taubenberger 等还比较了 1997 年香港人禽流感病毒和 2004 年越南人禽流感病毒的序列, 发现其含有对 1918 年流感病毒感染人有关键作用的 PB2 的 5 个氨基酸中的一个。这个结果暗示, 这些禽流感病毒必须发生这样和其它一些基因变化, 才会在人群传播。因此, 及时监测人禽流感病毒的关键区域的序列变异, 并在宿主体体高效复制以前, 及时追踪病毒演化, 从而制定相应的全球性防制策略。

2.2 疫苗研发 目前使用的流感疫苗是通过鸡胚生产并用物理方法纯化和灭活的灭活疫苗。每年, WHO 都会筛选出在人群中流行的代表株, 推荐用于生产疫苗。疫苗的效果取决于疫苗株必须和流行株有很大的相似性, 以保证产生有效的中和抗体。但是并非所有的这些候选毒株都适合于疫苗生产, 有些候选毒株在鸡胚上生长欠佳。因此, 现有的做法就是把高产的实验室毒株 A/PR/8/34(H1N1) 和当前流行毒株加以重配, 用以生产疫苗。但是通过这种方法得到高产毒株有很大的不确定性, 而且这种方法只能适合于直接从鸡胚分离的毒株; 而从某些细胞系中分离得到的毒株就不能通过这个途径成为疫苗株。

反向遗传学的问世和发展为生产合适的疫苗株提供了可能性。其一, 与以前那种“命中或错过”的疫苗株筛选方法相比, 这种方法直接而合理; 其二, 反向遗传学可以消除那些非允许细胞系分离毒株可能带来的污染或者其他病原体; 其三, 通过对质粒进行操作, 可以改造 HA 和其他影响病毒毒力的基因, 以去除那些致病因素。

应用反向遗传学可以开发对特定基因进行敲除的弱毒

株,比减温培养条件下含单个碱基变化的 ts 和 ca 突变株更为稳定。已知流感病毒的 NS1 蛋白可以抑制干扰素引起的抗病毒效应。将 NS1 蛋白截短后,例如只保留 N 端的 99 或 126 个氨基酸,对小鼠只产生短暂的抗干扰素效应,由此得到的重配病毒可作为疫苗的供体株。另一个有前途的策略是产生 M2 基因的敲除突变株。敲除了 M2 基因,就会得到一个在细胞培养物上生长良好,在小鼠体内生长能力差的复制缺陷株^[13]。

Brownlee 研究小组^[14]所采取的策略是在保守的病毒 RNA 启动子区进行碱基替代。利用 12 质粒系统改变保守碱基,就会得到致弱毒株。这种方法的可行性已在 PA、NA 和 NS 基因上得到证明。如果在病毒基因组的 8 个片段中任意片段都能引入突变,就会产生弱毒株。这种突变对研制活疫苗的供体株很有用处。

反向遗传学还可使灭活疫苗的研制周期缩短,工艺简化。传统的方法耗时繁琐,并且要求足够的鸡胚供应,这对应流感大流行是不现实的。如前所述,Schickli 和 Hoffmann 等分别使用不同的质粒系统得到重配病毒。这些病毒在鸡胚上或哺乳动物细胞上有很高的血凝滴度,并有亲代流行株的表面抗原。当新的毒株流行之际,只需将流行毒株和高产供体株加以重配,就可以得到新的疫苗株。利用反向遗传学进行疫苗研制的不利之处在于使用了 293T 和 MDCK 细胞。前者是转化细胞系,后者适宜性也一直得到质疑,故不适于生产人用疫苗。另一局限处在于,人 RNA 聚合酶 I 启动子只适合于人传代细胞或其原代细胞。Ozaki 等在 8 质粒系统探讨了利用 Vero 细胞进行转染的可能性。Vero 细胞是允许用于疫苗生产的细胞。在胰蛋白酶存在下,病毒可以在 Vero 细胞进行复制。较之鸡胚源疫苗,在 Vero 细胞上得到的流感疫苗可以产生相对强的体液免疫效应和更高的细胞毒性 T 淋巴细胞反应^[15]。

基于此,反向遗传学是应对流感大流行的一个重要手段。人感染禽流感已见于 1997 (H5N1)、1999 (H9N2)、2003 (H5N1 和 H7N7)、2004 (H5N1 和 H7N3)、2005 (H5N1)。在这些 A 型流感病毒中,H5 和 H7 亚型和高致病性感染密切相关。其致病性与糖蛋白 HA 的裂解位点处多个氨基酸基序相关。这些基序的存在,累及多个存在外源性蛋白酶的组织和器官。从这个角度说来,虽然目前所用的疫苗多源自鸡胚,但安全性还尚待考察,因其可能会引起潜在的公共卫生问题。为研制高致病性流感病毒的疫苗候选株,Subbarao 等^[16]和 Webby 等^[17]分别采用 12 质粒系统和 8 质粒系统,各自敲除了 1997 年和 2003 年的 H5N1 毒株的碱性氨基酸基序。这些疫苗株含 H5N1 的修改的 HA 和 NA,以及 A/PR/8/34 的内部基因,在鸡胚上生长良好,得到高滴度的子代病毒。含修饰的 HA 的病毒与野毒株相比,其对鸡和小鼠的致病力都降低了。Subbarao 等报道,甲醛灭活 1997 突变重配株激发的免疫效应与同样灭活的 H5N1 野毒株相当。Stech 等则另辟蹊径,将血凝素蛋白上的胰蛋白酶裂解位点突变为弹性蛋白酶裂解位点,从而获得一个致弱突变株。与致死的野毒株相比,其小鼠上完全致弱。以 10^5 PFU 的重配病毒免疫小鼠,其能保护小鼠抵抗致死剂量的野生病毒攻击^[18]。

2.3 病毒毒力及其致病性研究 已知从人分离到的禽流感病毒包括高致病性和低致病性两类。不同的病毒在鼠中引起的疾病与在人群中引起的疾病相关。为了弄清不同致病性的分子基础,利用 12 质粒系统产生了高致病性的禽流感 H5N1 亚型的 HK483 株和无致病性的 HK486 株^[19]。然后将 HK483 株的每个基因片段引入 HK486 株,检测重配后的病毒对小鼠的致病性。当将 HK483 株的 PB2 基因引入到 HK486 株后,HK486 株致病性增加;反之,HK483 株得到减毒。由此看来 HK483 株的 PB2 基因决定了病毒的潜在致病性。为寻找 PB2 中决定致病性的关键位点,将编码的单个氨基酸替换,得到重配病毒,从而发现两个毒株的 PB2 蛋白有 8 个氨基酸的差异。进一步发现 627 位的谷氨酸是决定高致病性的关键位点。另外,研究发现,HK486 株的 HA 的 227 位由丝氨酸变化为异亮氨酸时,其毒力降低。

Salomon 等^[20]在 8 质粒系统中研究了一个对人类致死的毒株 A/Vietnam/1203/04 (VN1203) 和一个非致病毒株 A/chicken/Vietnam/C58/04 (CH58) 在雪貂和小鼠上的致病性。发现两者的血凝素分子上有 6 个氨基酸的差异、相同的剪切位点和禽样的 α -(2,3) 连接受体特异性。奇怪的是,交换他们的血凝素和神经氨酸酶基因并没有改变他们各自的致病性,但是以 CH58 置换 VN1203 的多聚酶基因后,使后者完全致弱并降低了多聚酶活性。以 CH58 置换 VN1203 的 NS 基因后,对雪貂的致病性得以降低,而对小鼠的致病性未变。这揭示了,具有可剪切的血凝素的禽 H5N1 病毒,其多聚酶基因(PB2、PB1 等)必须进行适应性的变化,才能突破种属屏障,从而在哺乳动物产生高毒力。

2.4 病毒基因组结构与功能的研究 利用反向遗传学,可以对病毒的编码基因进行定向突变,从而可以知道该基因的编码产物在病毒的生命周期中的作用,从而为药物和疫苗设计奠定结构生物学和细胞生物学的基础。

有学者根据 A/HK/213/03 (H5N1) 和 A/Vietnam/1203/04 (H5N1) 两株病毒的血凝素蛋白抗原性不同筛选出两个候选疫苗^[21]。这两者的 HA1 亚单位有 10 个氨基酸不同,其中 A/Vietnam/1203/04 毒株的 154 位有潜在的糖基化位点。为了评价主要的 5 个抗原位点对免疫原性和免疫保护的影响,他们包装产生了一系列有 1 个或 2 个氨基酸不同的全病毒。将这些病毒灭活后免疫雪貂,能产生很高的中和抗体,但是血凝抑制效价很低。而 HA 的 223 位 S 替换为 N (A/HK/213/03) 后,血凝效价就提高了。这个结果暗示,HA 上的特定残基例如 N223,可以增加血凝滴度的敏感性。这是由于受体特异性和抗原抗体结合特异性改变了。随后通过突变得到的疫苗,能使雪貂抵抗 A/Vietnam/1203/04 的攻击。

又如,流感病毒的 M1 蛋白和 HA、NA 蛋白协同作用,促进了病毒粒子的装配。而含 97 个氨基酸的 M2 蛋白是否在病毒装配中发挥了作用? Horimoto 等^[22]利用 12 质粒系统产生了一系列的 M2 胞质尾区敲除突变体。研究发现,敲除 M2 的 C 末端 22 个氨基酸的重配病毒在电镜下可见,但是生长状况较野生病毒欠佳。分析该重配病毒,发现其 RNP 较野生病毒明显减少。在形态学上,野生病毒是球形的,而重配病毒呈丝状。丙氨酸分区诱变法进一步揭示,M2

胞质尾区的 74~79 位氨基酸在病毒粒子的形态学和感染力中有重要作用。由此说明, A 型流感病毒的 M2 胞质尾区在病毒的装配和形态发生上扮演了重要角色。

3 结语

反向遗传学使得人们可以对负链 RNA 病毒的基因组直接进行修饰, 为研究病毒的复制和装配提供了有力的手段。未来, 反向遗传学的应用领域会进一步扩大, 人们对单个基因在病毒毒力和致病性方面作用的认识进一步清晰, 从而为筛选活疫苗的候选株提供更合理的基础。对于灭活疫苗, 反向遗传学可以更加准确地弄清增强疫苗重配株在鸡胚或者细胞培养上增殖的特定序列, 这对降低疫苗成本和评价应对流感大流行疫苗的效能有显著贡献。但是, 利用反向遗传学生产的疫苗在许多国家被界定为基因修饰有机体, 因此在准许作为临床使用之前, 广泛的安全性实验和争论将会持续。

如上所述, 反向遗传学对阐明病毒的基因组结构与功能, 从而对药物设计、理解流感病毒变异和跨种属传播的分子机制等方面仍将会继续发挥其重要作用。例如, 阐明流感病毒的宿主特异性和致病性是流感病毒研究的未来方向之一, 其中一个注目的问题是: 为何禽 H5N1 病毒没有和人流感病毒发生重配? 弄清这一问题的唯一方法就是利用反向遗传学在实验室条件下模拟这个重配过程, 将重配的病毒和野毒株加以比较, 从而探讨其分子机制^[23]。另外, 反向遗传学可能对研究病毒基因如何发生变异、病毒是如何通过编码产物逃避宿主的免疫反应等机理的研究都会发挥重要的作用。因此, 反向遗传学同 RNAi、SEL EX 等定向进化技术一样, 仍将是流感病毒研究中一个重要的研究工具。

参考文献:

- [1] Berg P. Co-chairman's remarks: reverse genetics: directed modification of DNA for functional analysis [J]. *Gene*, 1993, 35 (1 - 2) : 261 - 264.
- [2] Neumann G, Kawaoka Y. Reverse genetics of influenza virus [J]. *Virology*, 2001, 287 (2) : 243 - 250.
- [3] Parvin J D, Palese P, Honda A, et al. Promoter analysis of influenza virus RNA polymerase [J]. *J Virol*, 1989, 63 (12) : 5142 - 5152.
- [4] Enami M, Luytjes M, Krystal M, et al. Introduction of site-specific mutations into the genome of influenza virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87 : 3802 - 3805.
- [5] Neumann G, Zobel A, Hobom G. RNA polymerase F mediated expression of influenza viral RNA molecules [J]. *Virology*, 1994, 202 (1) : 477 - 479.
- [6] Neumann G, Watanabe T, Ito H, et al. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 : 9345 - 9350.
- [7] Hoffmann E, Webster R G. Unidirectional RNA polymerase F polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81 (pt12) : 2843 - 2847.
- [8] Neumann G, Fujii K, Kino Y, et al. An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102 (46) : 16827 - 16829.
- [9] Kuiken T, Holmes E C, McCauley J, et al. Host species barriers to influenza virus infections [J]. *Science*, 2006, 312 (5772) : 394 - 397.
- [10] Hatta M, Halfmann P, Wells K, et al. Human influenza A viral genes responsible for the restriction of its replication in duck intestine [J]. *Virology*, 2002, 295 (2) : 250 - 255.
- [11] Landolt G A, Karasin A I, Schutten M M, et al. Restricted infectivity of a human-lineage H3N2 influenza A virus in pigs is hemagglutinin and neuraminidase gene dependent [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44 (2) : 297 - 301.
- [12] Taubenberger J K, Reid A H, Lourens R M, et al. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes [J]. *Nature*, 2005, 437 (7060) : 889 - 893.
- [13] Palese P, Garcia S A. Influenza vaccines: present and future [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110 (1) : 9 - 13.
- [14] Catchpole A P, Mingay L J, Fodor E, et al. Alternative base pairs attenuate influenza A virus when introduced into the duplex region of the conserved viral RNA promoter of either the NS or the PA gene [J]. *J Gen Virol*, 2003, 84 (3) : 507 - 515.
- [15] Ozaki H, Govorkova E A, Li C, et al. Generation of high-yielding influenza A virus in African green monkey kidney (Vero) cells by reverse genetics [J]. *J Virol*, 2004, 78 (4) : 1851 - 1857.
- [16] Subbarao K, Chen H, Swayne D, et al. Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics [J]. *Virology*, 2003, 305 (1) : 192 - 200.
- [17] Webby R J, Perez D R, Coleman J S, et al. Responsiveness to a pandemic alert: use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccine [J]. *Lancet*, 2004, 363 (9415) : 1099 - 1103.
- [18] Stech J, Garn H, Wegmann M, et al. A new approach to an influenza live vaccine: modified of the cleavage site of hemagglutinin [J]. *Nat Med*, 2005, 11 (6) : 683 - 689.
- [19] Hatta M, Gao P, Halfmann P, et al. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses [J]. *Science*, 2001, 293 (5536) : 1840 - 1842.
- [20] Salomon R, Franks J, Govorkova E A, et al. The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04 [J]. *J Exp Med*, 2006, 203 (3) : 689 - 697.
- [21] Hoffmann E, Lipatov A S, Webby R J, et al. Role of specific hemagglutinin amino acids in the immunogenicity and protection of H5N1 influenza virus vaccines [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102 (36) : 12915 - 12920.
- [22] Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Kawaoka Y, et al. The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly [J]. *J Virol*, 2006, 80 (11) : 5233 - 5240.
- [23] Stohr K. Avian influenza and pandemics: research needs and opportunities [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352 (4) : 405 - 407.