

汉坦病毒包膜糖蛋白 G2 重组腺病毒的构建及其在 HeLa 细胞中的表达

呼延霆, 薛小平, 宋凯, 汪桦, 杨慧, 王伟

西北工业大学生命科学院, 西安 710072

摘要: 本研究旨在构建可表达汉坦病毒(HTNV)糖蛋白 G2 的重组腺病毒。应用 PCR 方法扩增 G2 编码基因, 经 T/A 克隆、测序鉴定后再亚克隆到腺病毒 shuttle 载体 pAd5-CMV 中并用磷酸钙沉淀法分别将携带 G2 编码基因的重组腺病毒 shuttle 载体与携带报告基因 *eGFP* 的腺病毒骨架质粒共转染 HEK293 细胞, 包装、扩增、纯化后得到携带 HTNV 糖蛋白 G2 编码基因的重组腺病毒; 用重组腺病毒感染 HeLa 细胞并收获蛋白, 间接免疫荧光、Western blotting 检测蛋白表达。经酶切鉴定表明已成功构建了携带 G2 基因的重组腺病毒载体; RT-PCR 鉴定表明目的基因能够在感染重组腺病毒的 HeLa 细胞中转录; 荧光显微镜观察重组腺病毒感染的 HeLa 细胞, 可见报告基因 *eGFP* 的表达; 间接免疫荧光法和 Western blotting 均证实表达产物可被抗 G2 单克隆抗体所识别, 表明糖蛋白 G2 在感染细胞中得到了表达。本研究成功构建了可表达 HTNV 包膜糖蛋白 G2 的重组腺病毒, 转染宿主细胞可稳定表达目的蛋白, 为 HTNV 糖蛋白 G2 的结晶、结构解析研究以及新型汉坦病毒疫苗的研制奠定了基础。

关键词: 汉坦病毒, 包膜糖蛋白 G2, 重组腺病毒

Construction of a recombinant adenovirus carrying the Hantaan virus glycoprotein G2 gene and its expression in HeLa cells

Ting Huyan, Xiaoping Xue, Kai Song, Hua Wang, Hui Yang, and Wei Wang

Faculty of Life Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China

Abstract: We constructed the recombinant adenovirus expressing the glycoprotein G2 of Hantaan virus. Firstly we obtained coding gene fragment of G2 by PCR, and subsequently inserted the gene of interest into the Adenoviral pShuttle vector pAd5-CMV. Then we co-transfected the recombinant pShuttle vector and adenovirus skeleton plasmid into HEK293 cells by Calcium phosphate precipitation method. After the recombinant adenovirus were packaged and amplified in HEK293 cells, we observed the expression of reporter gene *eGFP* by fluorescent microscopy, and we obtained the recombinant adenovirus containing Hantaan virus glycoprotein G2. The recombinant adenoviruses were used to infect HeLa cells and the expressed protein was detected by Indirect Immuno-fluorescence and Western blotting. The construct was confirmed at several levels: first restriction enzyme analysis demonstrated that the recombinant adenovirus vector was constructed correctly, second RT-PCR showed that the G2 gene could

Received: June 22, 2009; **Accepted:** September 6, 2009

Supported by: Basic Scientific Research Foundation of Northwestern Polytechnical University (No. 003).

Corresponding author: Xiaoping Xue. Tel: +86-29-88460541; Fax: +86-29-88460541; E-mail: Xiaoping@fmmu.edu.cn

西北工业大学基础科研基金(No. 003)资助。

transcribe correctly in HeLa cells. Then Fluorescent microscopy proved the expression of *eGFP* in the infected HeLa cells. Finally, Indirect Immuno-fluorescence and Western-blot confirmed the expression of interested protein identified by anti-G2 monoclonal antibody. In conclusions, this study successfully constructed the recombinant adenovirus containing Hantaan virus envelope glycoprotein G2, meanwhile obtained the G2 protein, it may lay solid foundation for the structure study of G2 protein and the new vaccine of Hantaan virus.

Keywords: Hantaan virus, envelope glycoprotein G2, recombinant adenovirus

汉坦病毒归属布尼亚病毒科, 主要引起人类的两种疾病: 肾综合征出血热(Hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)和汉坦病毒肺综合征(Hantavirus pulmonary syndrom, HPS)。HFRS是一种以发热、出血和肾功能损害为特征的全球性病毒性急性传染病, 对人类的生产生活造成很大危害, 病死率介于 40%~60%, 目前尚无特异有效的治疗药物。汉坦病毒属病毒是一种有包膜分节段的负链 RNA 病毒, 基因组包括 *L*、*M*、*S* 三个片段, 分别编码依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(RdRp)、包膜糖蛋白(G1、G2)和核蛋白(NP)。包膜糖蛋白是汉坦病毒重要的结构蛋白, 具有病毒毒力位点、细胞结合位点、中和抗原决定簇及特异性抗原位点等, 具有良好的免疫原性, 可刺激机体产生中和抗体, 对感染动物和人体产生保护作用^[1-3]。因此 HTNV 包膜糖蛋白不仅是研制 HFRS 基因工程疫苗或多肽疫苗的首选靶点, 而且对于研究 HTNV 病毒结构与功能具有重要意义。然而 HTNV 包膜糖蛋白 G1、G2 的体外高效表达一直是困扰各国研究者的难题, 本研究利用含多顺反子的腺病毒表达系统获得了 HTNV 包膜糖蛋白的稳定表达。

1 材料和方法

1.1 材料

HEK293 细胞、Hela 细胞购自美国 ATCC 公司。细胞培养基 DMEM 购自美国 GIBCO 公司。新生牛血清购自杭州四季青公司。所有细胞培养于含有 100 mL/L 新生牛血清、100 mg/L 青霉素及 1×10^4 U/L 链霉素的 DMEM 培养液中。

M56 质粒含汉坦病毒 76-118 株 M 基因全长片段, 由美国陆军传染病研究所 Schmaljohn 构建, 中国预防医学科学院病毒病防治研究所杭长寿教授惠赠。腺病毒 shuttle 载体 pAd5-CMV 及腺病毒骨架

载体为陕西师范大学生命科学院基因治疗实验室夏海滨教授惠赠; T 载体 pGEM T-easy 购自 Promega 公司。

E. coli DH5 α 等菌株由本室保存; 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶为 Fermentas 公司产品; DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司; 反转录试剂盒 PrimeScript RT-PCR Kit 购自 TaKaRa 公司; DNA Marker 和蛋白 Marker 为 Hybigen 公司和百泰克生物技术公司产品; 荧光染料 Hoechst 购自南京凯基生物科技发展公司; 针对 G2 的鼠源性单克隆抗体为第四军医大学微生物教研室惠赠, 羊抗鼠 IgG-R 罗丹明二抗购自美国 Santa Cruz 生物技术公司, IRDye 800 CW Goat Anti-Mouse IgG 荧光二抗购自美国 Li-Cor 生物技术公司。PCR 所用引物及产物测序均由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的克隆

根据 GenBank 发表的汉坦病毒包膜糖蛋白 G2 的 cDNA 序列(Accession No. GI:1022844), 综合利用 Primer5 和 Oligo6 引物设计软件设计 G2 的全长引物 (表 1)。

表 1 G2 PCR 扩增引物及其序列

Table 1 PCR primer sequences of G2

Primer name	Primer sequence (5'-3')
G2-F	GATCGAIGTGGATATTTCTTCTTG
G2-R	CACTAGIGATTTTTIATGCTTCCTTACG
RT-G2-F	TAAGTGTTGCCATGGGGAGGA
RT-G2-R	CTGAAATCCATCCCCTGATT

引物 G2-F 包含 *Cla*I 酶切位点, 引物 G2-R 包含 *Spe*I 酶切位点, 均以下划线标识。

以 M56 质粒为模板, 由上下游引物经 PCR 反应得到汉坦病毒包膜糖蛋白 G2 的全长基因片段, PCR 产物电泳后回收目的片段, 通过 T4 DNA 连接酶将目的基因克隆到 pGEM T-easy 载体中, 连接产物转

化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 涂布于含氨苄青霉素 (Amp 100 mg/mL) 的 LB 平板, 挑取单克隆进行酶切、测序鉴定获得阳性克隆。

1.2.2 重组腺病毒表达载体的构建及重组腺病毒的包装

将测序鉴定正确的阳性克隆载体 pGEMT/G2, 经 *Cla* I 与 *Spe* I 酶切后得到 G2 基因片段, 插入到腺病毒 shuttle 载体 pAd5-CMV 相应的酶切位点中, 获得重组载体 pAd5-CMV-G2。Pac I 酶分别线性化带有目的基因的腺病毒 shuttle 载体与腺病毒骨架载体, 用磷酸钙沉淀法共转染于 HEK293 细胞中。转染 7~10 d 后收获病毒原液, 然后在 HEK293 细胞中扩增。采用 CsCl 密度梯度离心法纯化重组病毒颗粒, 空斑试验检测重组病毒的滴度。所获得的重组腺病毒命名为 Ad5-CMV-G2。

1.2.3 重组腺病毒载体中 G2 基因的转录本分析

感染前 1 天, 将 HeLa 细胞接入 150 mm 培养皿, 待细胞铺满约 90% 时接种 5 μ L 的重组腺病毒, 感染后 36 h 收集细胞, Trizol 法提取细胞总 RNA, 以 *GAPDH* 作为内参, 未感染病毒的正常 HeLa 细胞作为对照, 使用 TaKaRa Prime Script RT-PCR Kit 合成第 1 链 cDNA, 用于检测 mRNA 转录的 RT-PCR 引物见表 1。扩增片段的长度预期为 171 bp, 琼脂糖电泳检测 RT-PCR 反应产物。

1.2.4 标记基因 eGFP 蛋白表达的鉴定

将含有相同病毒量(MOI)的重组腺病毒和对照腺病毒(即不表达任何基因的腺病毒 control)接种于含 20 mL/L NCS DMEM 的 150 mm 培养皿的 HeLa 细胞中, 感染 48 h 后, 在荧光显微镜下观察 eGFP 标记基因的表达。

1.2.5 间接免疫荧光检测表达产物

在 24 孔板中预置灭菌盖玻片, 常规方法培养 HeLa 细胞。待细胞铺满约 90% 时接种 2 μ L 的重组腺病毒, 感染后 36 h 取出盖玻片, 用树脂固定于载玻片上, PBS 洗涤 3 次, 用 4% 的多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗涤。加入 5% 的牛血清白蛋白封闭 2 h, 然后加入 0.1% Triton 稀释的 G2 mAb(1:300), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 振荡洗涤 3 次; 加入 1:100 稀释的罗丹明标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, 37 $^{\circ}$ C 放置 1 h 后 PBS 振荡

洗涤 3 次。滴加 50% 甘油封片并放置盖玻片。荧光显微镜下观察。

1.2.6 表达产物的 SDS-PAGE 及 Western blotting 鉴定

将重组腺病毒及对照腺病毒(Control)接种于含 20 mL/L NCS DMEM 的 150 mm 培养皿的 HeLa 细胞中, 2 h 后换为 50 mL/L NCS DMEM。72 h 后分别收获感染的 HeLa 细胞的裂解蛋白上清。取 15 μ L 样品加等量 2 \times 上样缓冲液, 95 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min, 12% SDS-PAGE 后半干转至 NC 膜, 脱脂奶粉封闭 1.5 h, 封闭结束后 NC 膜加含有针对 G2 的一抗室温孵育 1 h, NC 膜经充分洗涤然后加二抗(Goat anti mouse IRdye 680)避光室温孵育 1 h, 使用 Odyssey 红外荧光扫描仪进行结果扫描。

2 结果

2.1 G2 基因克隆的鉴定

根据前述方法扩增 G2 基因, 图 1 为 G2 基因 PCR 产物电泳示意图, 扩增产物与 pGEM T-easy 载体连接后, 阳性克隆用 *Cla* I 和 *Spe* I 双酶切, 会得到两条片段, 一条为 pGEM T 载体, 大小为 3.1 kb, 另一条为大小 1.5 kb 的目的片段(图 2)。结果表明 G2 基因已正确克隆到 pGEM T-easy 中, 可用于下一步实验。

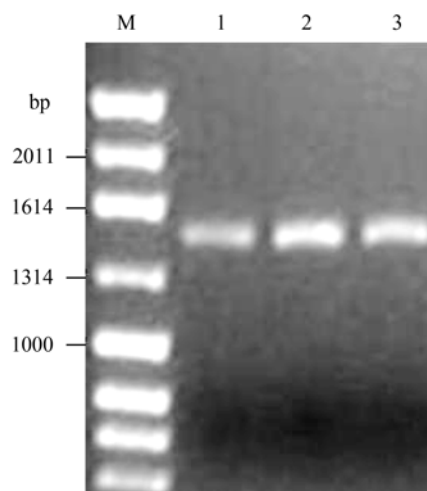


图 1 G2 基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of G2 gene PCR product. M: DNA marker; 1-3: the PCR product of G2 (1.5 kb).

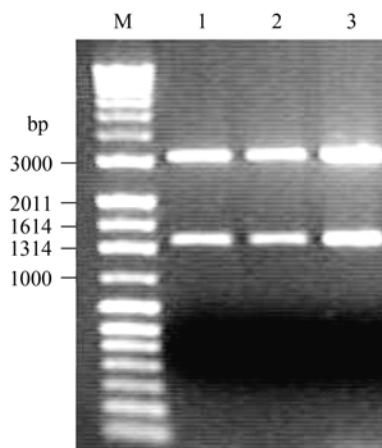


图2 pGEMT-G2质粒的 *Cla* I 和 *Spe* I 双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of plasmid pGEMT-G2 by restriction enzyme digestion (*Cla* I/*Spe* I). M: DNA marker; 1-3: plasmid of GEMT-easy(3.1 kb), G2 segment (1.5 kb).

2.2 重组载体 pAd5-CMV-G2 的鉴定

Cla I 和 *Spe* I 双酶切阳性的 pGEMT-G2 质粒, 胶回收 G2 片段后与同样用 *Cla* I 和 *Spe* I 双酶切的穿梭载体 pAd5-CMV 连接, 得到重组的 pAd5-CMV-G2 阳性质粒, 双酶切分别切出 7.3 kb 和 1.5 kb 两条片段, 与预期结果相符合(图 3), 表明 G2 基因已连接到腺病毒 shuttle 载体 pAd5-CMV, 可用于后续的动物转染实验。

2.3 重组腺病毒的鉴定

转染 HEK293 细胞 10 d 后, 在荧光显微镜下可观察到重组腺病毒“病灶”的产生(图 4), 表明已有重组腺病毒包装产生。包装好的重组腺病毒在 HEK293 细胞中大量扩增后, 用 CsCl 密度梯度离心纯化得到的重组腺病毒 DNA 为模板进行 PCR 鉴定, 结果得到 1.5 kb 的条带, 与 G2 基因片段大小一致(图 5), 表明 G2 基因已成功插入重组病毒 DNA 中。

通过病毒梯度稀释和噬斑计数, 按病毒滴度计算公式: 病毒滴度=噬斑数/(稀释度×每孔加入的病毒液的体积), Adeno-CMV-G2 重组腺病毒滴度约为 1.3×10^{10} PFU/mL。

2.4 感染 HeLa 细胞后的 RT-PCR 检测分析

图 6 为重组腺病毒感染 HeLa 细胞 48 h 后, RT-PCR 琼脂糖电泳结果, 可见在经过重组腺病毒

感染的实验组中有特异的条带, 约 170 bp 左右, 而在对照组(未感染重组病毒的 HeLa 细胞)中没有特异条带, 并且实验组和对照组均有内参 *GAPDH* 的条带, 结果符合预期的 171 bp 片段大小, 内参 *GAPDH* 为 210 bp(图 6)。

2.5 标记基因 *eGFP* 在 HeLa 细胞中的表达

重组腺病毒感染 HeLa 细胞 48 h 后, 荧光显微镜观察 *eGFP* 标记基因的表达, 对照组为方便观察用 Hoechst 染料染核。图中显示携带外源蛋白 G2 基因的重组腺病毒在敏感细胞 HeLa 中有报告基因 *eGFP* 的高表达, 对照组并无观察到绿色荧光(图 7), 表明重组腺病毒对于 HeLa 细胞的感染率较高。

2.6 间接免疫荧光的鉴定

重组腺病毒感染 HeLa 细胞 36 h 后, 通过间接免疫荧光法并利用荧光显微镜观察 *eGFP* 标记基因以及 G2 蛋白的表达, 结果表明携带外源蛋白 G2 基因的重组腺病毒在 HeLa 细胞中不仅稳定表达了报告基因 *eGFP*, 而且目的蛋白也获得了有效表达(图 8), 并且从图中可见目的蛋白主要表达在细胞膜上。

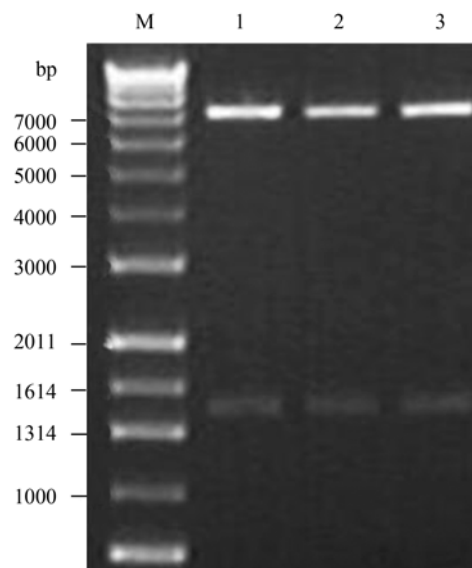


图3 pAd5-CMV-G2 的 *Cla* I 和 *Spe* I 双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of plasmid of pAd5-CMV-G2 by restriction enzyme digestion (*Cla* I/*Spe* I). M: DNA marker; 1-3: pAd5-CMV(7.3 kb) G2 segment(1.5 kb).

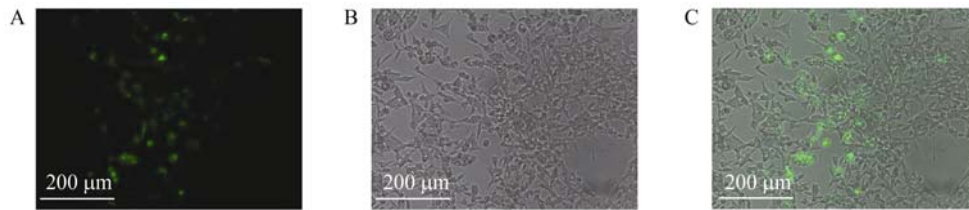


图 4 重组腺病毒的“病灶”荧光显微镜检测结果

Fig. 4 Observation of “focus of infection” in HEK293 cells infected with recombinant adenovirus by fluorescence microscope. (A) Focus (of infection) in HEK293 cells (10 \times). (B) HEK293 cells in the same normal vision (10 \times). (C) Merged picture (10 \times).

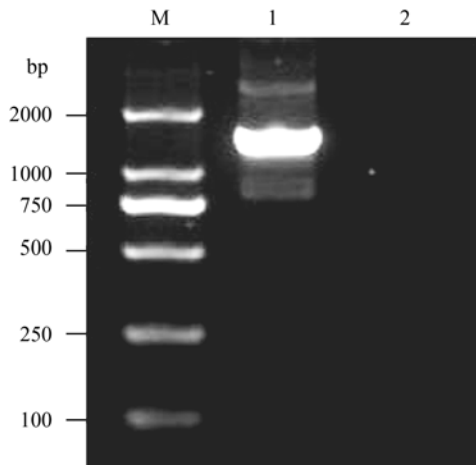


图 5 重组腺病毒载体 Ad5-CMV-G2 的 PCR 产物分析

Fig. 5 PCR analysis of recombinant adenovirus Ad5-CMV-G2. M: DNA marker; 1: PCR product of G2 (1.5 kb); 2: control.

2.7 表达产物的 SDS-PAGE 及 Western blotting 鉴定

将重组腺病毒和空载体对照分别感染 HeLa 细胞, 表达产物进行 SDS-PAGE 电泳检测, 可见大小约为 57 kD 的目的条带, 而空载体感染的细胞中无此条带(图 9)。Western blotting 结果表明(图 10), 用抗 G2 特异性单抗作为一抗, IRDye 800 CW Goat Anti-Mouse

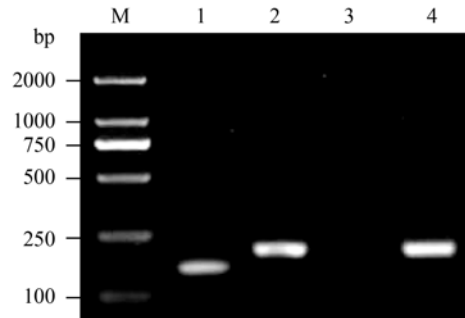


图 6 重组腺病毒 Adeno-CMV-G2 在 HeLa 细胞中的 RT-PCR 分析

Fig. 6 RT-PCR analysis of recombinant adenovirus Adeno-CMV-G2 in HeLa cells. M: DNA marker; 1: RT-PCR product of G2 in the infected HeLa cells; 2: RT-PCR product of GAPDH in the infected HeLa cells; 3: normal HeLa cells (control); 4: RT-PCR products of GAPDH in the normal HeLa cells.

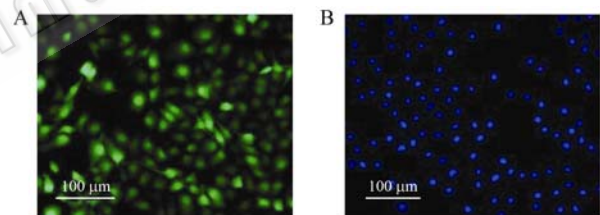


图 7 重组腺病毒的荧光显微镜检测结果

Fig. 7 Identification of *eGFP* expression in HeLa cells by fluorescence microscope. (A) HeLa cells infected with Ad5-CMV-G2. (B) HeLa cells infected with control vector.

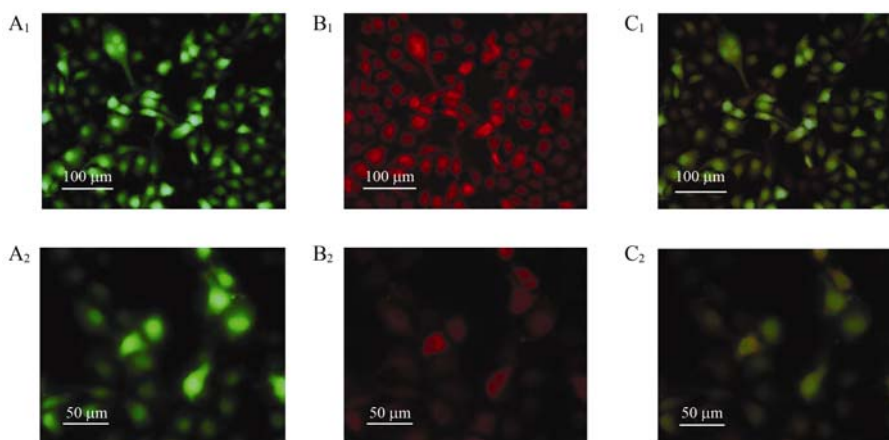


图 8 重组腺病毒的间接免疫荧光检测结果

Fig. 8 Detection of recombinant adenovirus Ad5-CMV-G2 by IFA. (A₁) Expression of *eGFP* in HeLa cells. (B₁) Expression of G2 in HeLa cells. (C₁) Merged picture. (A₂) Expression of *eGFP* in HeLa cells. (B₂) Expression of G2 in HeLa cells. (C₂) Merged picture.

IgG 荧光二抗红外荧光检测, 重组腺病毒在 HeLa 细胞中可表达相对分子质量约为 57 kD 的目的蛋白 G2。

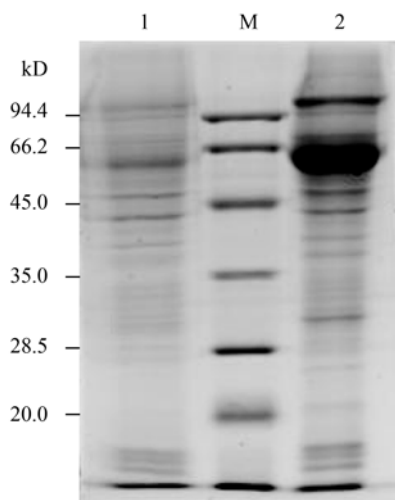


图 9 G2 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 9 SDS-PAGE analysis of expression protein of G2 gene. M: protein marker; 1: HeLa cells lysates of control vector; 2: HeLa cells lysates of Ad5-CMV-G2.

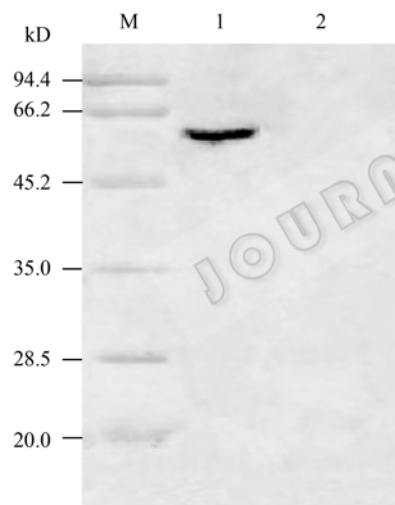


图 10 G2 基因表达产物的 Western blotting 分析

Fig. 10 Western blotting analysis of expression product of G2 gene. M: protein marker; 1: HeLa cells lysates of Ad5-CMV-G2; 2: HeLa cells lysates of control vector.

3 讨论

新型的活病毒载体疫苗是近年研究的热点^[4], 利用昆虫细胞、痘病毒载体表达病毒包膜糖蛋白国内外均有文献报道, 与其他载体相比, 重组腺病毒载体具有靶细胞种类多, 导入效率高; 不整合到宿主基因

组中, 不会引起插入突变; 容易得到高滴度病毒; 可插入大片段外源基因等优点, 是目前高效蛋白表达和基因治疗研究的首选载体^[5]。本研究所采用的腺病毒载体是一种新型的 5 型非复制型腺病毒载体, 滴度大, 感染效率高。用短肽精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (Arg-Gly-Asp, RGD) 对病毒载体的钮结构域 knob 进行遗传修饰, 提高了对 HeLa 细胞的感染效率。

构建抗病毒活疫苗的另一重要元件是靶抗原的选择, 病毒包膜糖蛋白位于病毒颗粒的表面, 病毒受体结合蛋白 (VAP)、中和性表位等主要存在于病毒包膜糖蛋白。多年来, 国内外学者已经构建了表达不同病毒包膜糖蛋白的重组腺病毒, 如狂犬病毒糖蛋白、登革热病毒包膜蛋白、呼吸道合胞病毒糖蛋白、型单纯疱疹病毒糖蛋白 B 等^[6-9]。由于糖蛋白结构特点, 表达产物多肽链的折叠、二硫键的形成、糖基化的有无以及糖基化的类型常常影响表达产物的合成分泌、生物活性、体内稳定性以及免疫原性等特性^[10], 因此某些重要的病毒包膜糖蛋白的体外高效表达, 仍然是比较困难的。本研究采用线性化的穿梭质粒和骨架质粒共转染 HEK293 细胞得到重组腺病毒^[11-12], 与在细菌中同源重组的方法比较, 该方法避免了同源重组体繁琐的筛选过程, 较为快速、简便。启动子的强弱是影响基因表达的一个重要因素, 有文献报道 CMV 启动子的效率略高于 RSV LTR^[13-14]。在重组腺病毒载体的设计中, 将 G2 片段克隆在腺病毒穿梭载体中的 E1 区, eGFP 克隆在腺病毒骨架载体的 E3 区, 两种蛋白使用的是不同的启动子起始转录, E1 区含有 CMV 启动子, E3 区含有 RSV 启动子, 利用启动子的效率差异可提高目的蛋白的表达量。作为本实验中观察病毒感染效率的报告基因 eGFP 是 GFP 的增强变体, 其荧光强度是 GFP 的 35 倍, 即使表达量较低, 在荧光显微镜下也可被检测到。

汉坦病毒是 HFRS 的病原体。国内外近年来虽已研制出 HFRS 的灭活疫苗, 但从部分人群试用的情况来看, 该类疫苗还存在明显不足, 主要是其诱导机体产生中和抗体的能力较弱。国内外学者研究发现 HNTV 包膜糖蛋白含有中和抗原决定簇, 可刺激机体产生中和抗体, 而对感染动物和人体起到保护作用, 且糖蛋白的中和抗原位点主要位于 G2 上,

在宿主抗病毒免疫的中起重要作用。自从 Pensiero 等于 1988 年首次在痘苗病毒载体中成功表达出 HNTV 包膜糖蛋白之后^[15], 国内外研究机构用包括大肠杆菌原核表达系统、酵母表达系统、杆状病毒、腺病毒等多种载体表达了重组 HNTV 包膜糖蛋白, 尽管已取得了一定的进展, 但由于在汉坦病毒感染的细胞中 G1、G2 的表达水平低, 因此利用高效安全的重组表达载体和哺乳动物真核表达系统大量地人工合成并提取包膜蛋白, 在新型汉坦病毒疫苗的研制和 HFRS 的治疗方面具有重要意义。

本研究成功地构建了含有 G2 的重组腺病毒穿梭载体 pAd5-CMV-G2, 并和骨架载体共转染能稳定表达部分腺病毒基因编码蛋白的 HEK293 细胞, 包装出完整的重组腺病毒, 感染 HeLa 细胞后, 通过间接免疫荧光和 Western blotting 方法鉴定了包膜糖蛋白 G2 的表达。HNTV 包膜糖蛋白 G2 有复杂的空间构象, 其多种生物学活性在很大程度上都依赖于其空间构象的保持, 本研究中重组腺病毒所表达的 G2 蛋白在相对分子量 57 kD 与天然 G2 的相对分子量近乎一致, 特异抗体检测证实, 目的蛋白在宿主细胞中得到了正确的翻译; 间接免疫荧光结果显示, 表达的目的蛋白主要分布在重组病毒感染细胞的细胞膜上, G2 蛋白为单次跨膜型膜蛋白, 表达产物定位于胞膜上有助于其保持天然构象。本研究利用重组腺病毒载体在体外哺乳细胞中成功表达了 G2 蛋白, 下一步研究将是利用已构建好的重组腺病毒, 感染细胞大量分离纯化 G2 蛋白, 免疫动物, 观察其诱导特异性中和抗体产生的情况以及对动物的免疫保护活性。同时为进行 HNTV 糖蛋白 G2 的结晶和结构解析研究奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Schmaljohn CS, Dalrymple JM. Analysis of Hantaan virus RNA: evidence for a new genus of bunyaviridae. *Virology*, 1983, **13**(1): 482-491.
- [2] Schmaljohn CS, Jennings GB, Hay J, *et al.* Coding strategy of the S genome segment of Hantaan virus. *Virology*, 1986, **15**(5): 633-643.
- [3] Schmaljohn CS, Schmaljohn AL, Dalrymple JM. Hantaan virus M RNA: coding strategy, nucleotide sequence, and gene order. *Virology*, 1987, **15**(7): 31-39.
- [4] Jeffrey D Ahlers, Igor M. Strategies for recruiting and targeting dendritic cells for optimizing HIV vaccines. *Trends Mol Med*, 2009, **15**(6): 263-274.
- [5] Vorburger SA, Hunt KK. Adenoviral gene therapy. *Oncologist*, 2002, **7**(1): 46-59.
- [6] Zhao ZP, Xia XZ, Hu RL, *et al.* Construction and identification of recombinant canine adenovirus type2 expressing exogenous rabies glycoprotein (Rgp). *Acta Microbiol Sin*, 2007, **47**(2): 335-339.
赵忠鹏, 夏咸柱, 扈荣良, 等. 表达狂犬病毒糖蛋白抗原的重组犬 2 型腺病毒的构建及鉴定. *微生物学报*, 2007, **47**(2): 335-339.
- [7] Holman DH, Wang D, Raviprakash K, *et al.* Two complex, adenovirus-based vaccines that together induce immune responses to all four dengue virus serotypes. *Clin Vaccine Immunol*. 2007, **14** (2): 182-189.
- [8] Yuan Y, He JS, Fu YH, *et al.* Construction and identification of replication deficient recombinant adenovirus encoding F gene of subgroup A human respiratory syncytial virus. *Chin J Exp Clin Virol*, 2008, **22**(6): 23-28.
袁媛, 何金生, 付远辉, 等. 人呼吸道合胞病毒融合糖蛋白非复制型重组腺病毒的构建和表达. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2008, **22**(6): 23-28.
- [9] WS Gallichan, Rosenthal KL. Specific secretory immune responses in the female genital tract following intranasal immunization with a recombinant adenovirus expressing glycoprotein B of herpes simplex virus. *Vaccine*, 1995, **13**(16): 1589-1595.
- [10] Shi X, Elliott RM. Analysis of N-linked glycosylation of hantaan virus glycoproteins and the role of oligosaccharide side chains in protein folding and intracellular trafficking. *J Virol*, 2004, **78**(10): 5414-5422.
- [11] Anderson RD, Haskell RE, Xia H, *et al.* A simple method for the rapid generation of recombinant adenovirus vectors. *Gene Therapy*, 2000, **12**(7): 1034-1038.
- [12] Xia H, Mao Q, Davidson BL. The HIV Tat protein transduction domain improves the biodistribution of β -glucuronidase expressed from recombinant viral vectors. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**(7): 640-644.
- [13] Yu ZY, Ren YF, Shen BF. Comparison of CMV promoter and RSV LTR in expression of human soluble IL-6R gene. *Lett Biotechnol*, 1999, **10**(2): 95-99.
于占洋, 任蕴芳, 沈培奋. CMV 启动子和 RSV LTR 启动子表达 sIL-6R 效率的比较. *生物技术通讯*, 1999, **10**(2): 95-99.
- [14] Fred AMA, Jessica H, Roland W, *et al.* Production of the chimerical plasminogen activator K2tu-PA in CHO cells. *J Biotech*, 1995, **42**(3): 221-233.
- [15] Pensiero MN, Jennings GB, Schmaljohn CS, *et al.* Expression of the hantaan virus M genome segment by using a vaccinia virus recombinant. *J Virol*, 1988, **62**(3): 696-702.